

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA AMARAL LAPINSKI

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS VÍRUS INFLUENZA B NO PARANÁ ENTRE
OS ANOS DE 2000 A 2016: IMPLICAÇÕES NA ESTRATÉGIA DE IMUNIZAÇÕES
PARA INFLUENZA

CURITIBA

2017

BRUNA AMARAL LAPINSCKI

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS VÍRUS INFLUENZA B NO PARANÁ ENTRE
OS ANOS DE 2000 A 2016: IMPLICAÇÕES NA ESTRATÉGIA DE IMUNIZAÇÕES
PARA INFLUENZA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Mara Raboni

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lapinski, Bruna Amaral.

Epidemiologia molecular dos vírus influenza B no Paraná entre os anos de 2000 a 2016: implicações na estratégia de imunizações para influenza. / Bruna Amaral Lapinski. – Curitiba, 2017.
108 f. : il.

Orientadora: Sônia Mara Raboni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Influenza. 2. Vacinas. 3. Vírus da influenza. 4. Infecções respiratórias. I. Título. II. Raboni, Sônia Mara. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20.ed.) 576.64



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Epidemiologia molecular dos vírus influenza B no Paraná entre os anos de 2000 a 2016: Implicações na estratégia de imunizações para influenza”

por

Bruna do Amaral Lapinski

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Profa. Dra. Sonia Mara Raboni – Presidente

Dra. Ana Luiza Pamplona Mosimann

Dra. Marion Burger

Curitiba, 07 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

O caminho até essa etapa foi longo e por isso não poderia deixar de agradecer àqueles que me ajudaram a fazer acontecer.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Sonia Raboni, pela oportunidade, por compartilhar de sua experiência e conhecimento, pelo olhar crítico, por esperar de nós mais e o melhor.

Agradeço à equipe do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná não apenas pelo material biológico ou dependências físicas, sem os quais seria inviável desenvolver o trabalho, mas principalmente por serem o colo, os ouvidos, o conselho.

Agradeço à equipe do Lacen-PR pela parceria firmada, pelas amostras, pela receptividade, pela contribuição científica.

Agradeço a minha mãe, por tudo.

Agradeço à família, em especial meu pai que apesar de longe fez o que pode para me apoiar e meu irmão a quem decepcionei quando decidi ficar em Curitiba para o mestrado, mas que mesmo assim me incentivou a cada instante e acredita me ver em breve indicada ao Nobel.

Por fim, agradeço ao programa de Pós graduação e à Capes.

RESUMO

Influenza, ou gripe, é uma infecção respiratória aguda causada pelos vírus influenza do tipo A, B e em menor frequência C. Crianças, idosos e pacientes com comorbidades são os grupos de maior risco para a evolução de doença severa (síndrome respiratória aguda grave – SRAG), que é responsável por altas taxas de hospitalização e mortes que ocorrem anualmente em 10% da população. Indicadores epidemiológicos vêm demonstrando como o impacto de influenza B (Flu B) é substancial tanto em número de mortes infantis, quanto em evolução das infecções para SRAG, com altos números de admissões em unidades de terapia intensiva. No Brasil, a vacina fornecida pelo Programa Nacional de Imunização é trivalente, esta vacina consiste apenas de uma das duas linhagens de Flu B, as quais co-circulam anualmente. Com o objetivo de realizar a caracterização molecular dos vírus Flu B circulantes no estado do Paraná, o estudo investigou as amostras clínicas positivas para Flu B provenientes da vigilância epidemiológica do influenza no estado do Paraná armazenadas no Laboratório Central do Paraná (LACEN-PR) e de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) entre 2000 e 2016. As linhagens de Flu B – Victoria (B/Vic) e Yamagata (B/Yam) - foram identificadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-q-PCR). Em adição, foi reportado o perfil clínico dos pacientes infectados pelas distintas linhagens e a correspondência entre linhagem da composição vacinal e a linhagem prevalente na população. Dentre 450 amostras incluídas no estudo 423 (94%) foram caracterizadas. No período avaliado as linhagens B/Yam e B/Vic co-circularam em um padrão de alternância durante os anos em uma frequência de 48% e 52% respectivamente. A infecção por Flu B foi prevalente em mulheres (61%). Enquanto não foi observada distinção de gênero em infecções pela linhagem B/Yam, foi observado que B/Vic foi predominante em mulheres (71%). A mediana de idade dos pacientes infectados por B/Vic (23 anos; IIQ 11-35) foi significativamente menor do que a dos pacientes infectados por B/Yam (32 anos; 12-50). A linhagem B/Vic foi associada com evolução de SRAG (62%) e B/Yam com doença leve (61%). Foi observada diferença na circulação das linhagens entre as regiões do estado do Paraná. Na região noroeste verificou-se prevalência da linhagem B/Vic (67%) e prevalência de casos de SRAG (71%), na região sudeste prevalência de infecções por B/Yam e entre as duas regiões ambas as linhagens se distribuíram igualmente. Uma vez que sabe-se que as linhagens co-circulam e que é impossível prever com acurácia a prevalência de cada linhagem para a próxima temporada e tendo em vista o maior número de casos de doença grave em períodos de discordância entre composição vacinal e linhagem circulante, a caracterização molecular de Flu B é imprescindível para o monitoramento da dinâmica de infecção deste agente e ajuste das estratégias públicas de prevenção, imunização e tratamento do influenza com foco em diminuir o impacto da doença na população infectada.

Palavras-chave: linhagens de influenza B, vacina de influenza B, vigilância de infecções por vírus respiratórios.

ABSTRACT

Influenza, or flu, is an acute infectious respiratory disease caused by a global spread of influenza virus type A, B and, to a lesser extent, type C. Children, the elderly, and immunocompromised patients with chronic diseases are the most likely groups to severe disease (severe acute respiratory syndrome), responsible for high rates of hospitalization and death that occurs annually in 10% of the world population. Epidemiological indicators have shown how the impact of influenza B (Flu B) is substantial, both on the number of childhood deaths, but also in the development of severe acute respiratory infection (SARI), with high numbers of admissions in intensive care unit. In Brazil, the vaccine provided by the National Immunization Program is trivalent, consisting of only one of the two Flu B lineages, which co-circulate annually. The present study investigated influenza B infection in clinical samples collected by epidemiological surveillance and sent to Health Public Laboratory of Paraná (Lacen-PR), and hospitalized patients from hospital tertiary HC-UFPR, Brazil, from 2000 to 2016. Flu B lineages: Yamagata- (B/Yam) and Victoria-like (B/Vic) were identified by one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, it was reported clinical profile, outcome and the match between annual prevalent lineage and vaccine strain. Among 450 flu B positive samples evaluated, 423 (94%) were characterized. In the period both lineages B/Yam and B/Vic co-circulated in an alternating pattern with a frequency of 48% and 52%, respectively. Flu B infection was prevalent in females (61%). B/Yam infected both genders equally while B/Vic was predominant in females (71%). The median age of patients infected by B/Vic (23y; 11-35) was lower than the infected by B/Yam (32y; 12-50). Mismatching between the vaccine and predominant circulating strain was observed in 2006 and 2013 seasons, with a high concentration of SARI cases in 2013. We also observed that B/Vic was related with more cases of the SARI (62%) while B/Yam was related with influenza-like illness (ILI) cases (61%). In the same period, there were differences in the strains circulation in the Paraná state. B/Vic was prevalent in the northwest (67%) and Yamagata in southeast (60%) regions. Since lineages are known to co-circulate and it is impossible to predict accurately the prevalence of each strain for the coming season and in view of the greater number of cases of severe disease in mismatching vaccine seasons, the molecular characterization of Flu B is essential for the monitoring of the infection dynamics of this virus and adjustment of the public strategies of prevention, immunization and treatment of influenza with a focus on reducing the impact of the disease in the infected population.

Keywords: influenza B lineages, influenza vaccine, respiratory infection surveillance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EVOLUÇÃO DAS LINHAGENS ANTIGENICAMENTE DISTINTAS DE FLU B (1970-2006).	18
FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO GENOMA DO VÍRUS INFLUENZA B.	20
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA VIRAL DO VÍRUS INFLUENZA.	21
FIGURA 4 – COBERTURAS VACINAIS DA VACINA SAZONAL DE INFLUENZA POR GRUPOS PRIORITÁRIOS E ANO, BRASIL, 2011 A 2015.	32.
FIGURA 5 – TAXA DE COBERTURA DE VACINAÇÃO SAZONAL DE INFLUENZA EM IDOSOS DENTRE OS ESTADOS MEMBROS EU/EEA, 2011 A 2013.	32
FIGURA 6 – COBERTURA DE VACINAÇÃO SAZONAL DE INFLUENZA POR FAIXA ETÁRIA E TEMPORADA, EUA, 2009 A 2016.	33
FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES SENTINELAS (US) DE SG E SRAG/UTI DO SIVEP - GRIPE PARANÁ, 2016.,	35
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES.	42
FIGURA 9 – PREVALÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B NO ESTADO DO PARANÁ.	47
FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE LINHAGEM CARACTERIZADA NA POPULAÇÃO E LINHAGEM VACINAL POR ANO.	48
FIGURA 11 – FREQUÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B POR ANO RELACIONADO COM SEVERIDADE DE DOENÇA.	49

FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CASOS DE B/VIC E B/YAM ENTRE 2000 E 2016 POR MÊS.....50

FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO POR MÊS DE CASOS DE SRAG CAUSADOS POR B/VIC E B/YAM ENTRE 2000 E 2016.....50

FIGURA 14 - NÚMERO DE CASOS DE SG ENTRE AS DISTINTAS LINHAGENS DE INFLUENZA B, 2000 A 2016.....51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FREQUÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B POR ANO.....46

**TABELA 2 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELO
VÍRUS INFLUENZA B NO PERÍODO DE 2000 E 2016.....52**

**TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES INFECTADOS POR FLU B
ENTRE 2000 E 2016.....53**

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL DOS CASOS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE INTENSIVA DE TRATAMENTO.....83

ANEXO 2 - FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL DOS CASOS DE SÍNDROME GRIPAL QUE REALIZARAM A COLETA DE AMOSTRA.....85

ANEXO	3	–	ARTIGO	PUBLICADO
			87

LISTA DE SIGLAS

B/VIC – LINHAGEM DE INFLUENZA B *VICTORIA-LIKE*

B/YAM – LINHAGEM DE INFLUENZA B *YAMAGATA-LIKE*

CDC – CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

EIE – ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

EUA – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

FLU A – INFLUENZA A

FLU B – INFLUENZA B

HA - HEMAGLUTININA

HC-UFPR – HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IC – INTERVALO DE CONFIANÇA

IFI – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

IIQ – INTERVALO INTERQUARTIL

LACEN-PR – LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DO PARANÁ

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE

NA - NEUROAMINIDASE

NI – NÃO INFORMADO NA FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE INFLUENZA

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

OR – *ODDS RATIO*

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

RT-QPCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL COM TRANSCRIÇÃO REVERSA

SE – SEMANA EPIDEMIOLÓGICA

SG - SÍNDROME GRIPAL

SRAG – SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE

UTI – UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	GRIPE/INFLUENZA	13
2.1.1	Transmissão	13
2.1.1	Manifestações clínicas	14
2.1.1.1	<i>Síndrome gripal</i>	15
2.1.1.2	<i>Síndrome respiratória aguda grave</i>	15
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO	16
2.3	VÍRUS INFLUENZA B	17
2.3.1	Organização genômica	19
2.3.2	Estrutura do vírus	20
2.4	VARIAÇÃO ANTIGÊNICA	22
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	24
2.5.1	Métodos de diagnóstico por biologia molecular	25
2.6	TRATAMENTO	27
2.7	PROFILAXIA	28
2.8	VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	34
2.9	EPIDEMIOLOGIA	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVO	40
4.1	OBJETIVO GERAL	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	TIPO DE ESTUDO	41
5.2	AMOSTRAS CLÍNICAS	41
5.3	DESENHO EXPERIMENTAL	42
5.4	BIOLOGIA MOLECULAR	43
5.4.1	Extração genômica	43
5.4.2	PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-q-PCR)	44
5.5	AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA	45

5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6	RESULTADOS.....	47
6.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	47
6.2	COMPARAÇÃO ENTRE LINHAGENS DE INFLUENZA B CIRCULANTE E VACINAL.....	49
6.3	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	50
6.3.1	Sazonalidade.....	50
6.3.2	Características populacionais.....	52
6.4	DADOS CLÍNICOS.....	54
7	DISCUSSÃO.....	56
7.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	56
7.2	CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	60
7.3	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....	63
8	CONCLUSÃO.....	67
9	PERSPECTIVAS.....	68
10	CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Influenza ou gripe é uma doença respiratória infecciosa aguda de origem viral. Possui elevada transmissibilidade e distribuição global, com tendência a se disseminar facilmente em epidemias sazonais - com pico durante o inverno - decorrentes das suas variações antigênicas cíclicas (WEBSTER *et al.*, 1993).

A gripe é um grave problema de saúde pública, apresenta alta incidência, acometendo anualmente cerca de 10% da população mundial. Afeta todos os tipos de grupos sociais e etários, apresentando potencial para levar a complicações graves (OMS, 2014).

É uma das grandes preocupações das autoridades sanitárias mundiais devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade - principalmente nos grupos de alto risco para as infecções virais -, além de causar impacto na economia devido aos gastos diretos nos serviços de saúde e importantes perdas na produtividade da força de trabalho durante as epidemias (NOAH & NOAH, 2013).

Até os dias atuais, o principal foco dos estudos sobre a gripe tem sido os vírus influenza A (Flu A). Isto se deve tanto pela habilidade que estes vírus têm em mutar e causar graves pandemias, mas também por um conceito primário arraigado dentre a comunidade científica de que influenza B (Flu B) representa menor perigo para a saúde pública por ser menos incidente e mutagênico. Percebe-se esta diferença de foco ao observar que dentre os laboratórios de vigilância de influenza mundiais, menos de 10% das infecções por Flu B são caracterizadas molecularmente (JACKSON *et al.*, 2011; STUART-HARRIS *et al.*, 1985).

No entanto, os indicadores epidemiológicos têm mostrado um impacto substancial de flu B, tanto em número de mortes na primeira infância, como também no desenvolvimento de infecção respiratória aguda grave (SRAG), com um elevado número de internações em unidade de terapia intensiva (GLEZEN *et al.*, 2013). Essas evidências vêm enfatizando a necessidade de avaliar o perfil das infecções por Flu B visando compreender a dinâmica dessa dispersão viral na comunidade, bem como a efetividade das medidas preventivas adotadas pelos Programas Nacionais de Imunização (CAINI *et al.*, 2015).

No Brasil, entre 2013-2016 houve 10.033 casos de SRAG confirmados por gripe no Brasil. Dos quais 16% evoluíram para a morte. A gripe B foi responsável por

1.437 (14%) dos casos SRAG e apresentou um aumento da carga de doença quando avaliado o índice de óbitos: em 2013 os casos de morte foram 6%, em 2014 13%, em 2015 16% e em 2016 até semana epidemiológica (SE) 14 (antes do início da temporada de gripe) foram registrados 8% de óbito por Flu B (SVS, 2014, 2015c, 2016a, 2016b).

Uma explicação para a predominância de casos de Flu B nos últimos anos é a ineficiência da cobertura vacinal. No hemisfério norte a linhagem de Flu B selecionada para a vacina de influenza e a cepa circulante no mesmo período só coincidiram 5 vezes entre 10 temporadas (2001 a 2010), quando então adotou-se a vacina quadrivalente (BELSHE *et al.*, 2010). No Brasil, apesar das vacinas de 2012 e 2013 serem compostas de cepa de Yamagata, só foi observado uma reinserção desta linhagem a partir de 2014 (OPS, 2015).

Apesar da importância em caracterizar e diferenciar as linhagens de vírus Flu B, muitos laboratórios ainda não o fazem e os que fazem utilizam em grande parte a metodologia de inibição de hemaglutinação. Este método, entretanto, requer o isolamento viral - um processo demorado cujo sucesso está sob influência de vários fatores. Desta forma, métodos moleculares têm sido desenvolvidos para permitir a identificação das linhagens de forma rápida, específica e de alta sensibilidade. Estes métodos também diminuem o risco de contaminação cruzada e permitem diagnósticos em larga-escala (MACKAY, 2004).

O tratamento antiviral também é importante no manejo clínico das formas graves ou complicadas da gripe, mas as recomendações de tratamento também levam em consideração informações sobre o tipo de vírus de influenza circulante bem como a existência de mutações relacionadas à resistência aos medicamentos antivirais (NOAH & NOAH, 2013).

Uma vez que não há ferramentas ou estratégias capazes de eliminar completamente a transmissão, estudos envolvendo a caracterização epidemiológica, clínica e molecular destes agentes infecciosos, assim como a avaliação de diferentes metodologias diagnósticas, são imprescindíveis para a introdução de medidas de intervenção terapêutica e dos serviços de vigilância em saúde visando o controle da influenza.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GRIPE/INFLUENZA

Há milênios têm-se registros de uma doença com aspectos semelhantes ao que hoje se conhece como gripe. A primeira descrição científica data de 412 a. C. por Hipócrates, que relatou doença respiratória aguda que acometeu exército ateniense. O termo influenza surgiu na Itália, em 1580, para descrever que os aspectos clínicos de febre, de tosse e de calafrio de uma epidemia seriam decorrentes de “influências planetárias” (TALAVERA, 1999), entretanto, apenas em 1933, durante uma epidemia na Inglaterra, o vírus influenza foi isolado pela primeira vez (SMITH *et al.*, 1933).

A gripe é uma infecção viral aguda que afeta o sistema respiratório, atinge todas faixas etárias, podendo causar infecções recorrentes. A doença pode ser causada pelos vírus influenza A, B e C. Os vírus A e B apresentam maior importância clínica; estima-se que, em média, as cepas A causem 75% das infecções, mas em algumas temporadas, ocorre predomínio das cepas B (GLEZEN *et al.*, 2013 FALLEIROS *et al.*, 2016).

As infecções são caracterizadas pela degeneração das células epiteliais do trato respiratório com perda de epitélio ciliar e descamação. Os efeitos patológicos ocorrem devido aos danos causados ao epitélio respiratório combinado à resposta imune (HAYDEN & PALESE, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), estima-se que há mundialmente cerca de 1,2 bilhões de pessoas com risco elevado de complicações por gripe: 385 milhões de idosos acima de 65 anos de idade, 140 milhões de crianças, e 700 milhões de pessoas com doença crônica.

2.1.1 Transmissão

Os vírus influenza se replicam nas células epiteliais colunares do trato respiratório, misturam-se às secreções respiratórias e geram aerossóis, pequenas

gotículas que são espalhadas durante o ato de tossir, espirrar ou falar. Ambientes com aglomerações e fechados favorecem a transmissão (HILLEMANN, 2002).

O período de incubação dos vírus influenza varia entre um e quatro dias. Os sinais e sintomas da doença são muito variáveis, podendo ocorrer desde a infecção assintomática, até formas graves. A excreção viral nas secreções nasais usualmente surge 24 horas antes do início dos sintomas, dificultando a instituição de medidas profiláticas medicamentosas para a prevenção da doença. A excreção viral é máxima nos primeiros três dias após início dos sintomas, coincidindo com a piora clínica e aumento da temperatura (FIORE *et al.*, 2011).

A transmissão ocorre principalmente através do contato com partículas eliminadas por pessoas infectadas ou mãos e objetos contaminados por secreções. É muito elevada em ambiente domiciliar, creches, escolas e em ambientes fechados ou semi-fechados, dependendo não apenas da infectividade das cepas, mas também do número e intensidade dos contatos entre pessoas de diferentes faixas etárias (NETO *et al.*, 2003).

Estima-se que uma pessoa infectada seja capaz de transmitir o vírus para até dois contatos não imunes. As crianças com idade entre um e cinco anos são as principais fontes de transmissão dos vírus na família e na comunidade, sendo que podem eliminar os vírus por até duas semanas, enquanto indivíduos imunocomprometidos podem excretá-los por períodos mais prolongados, até meses (PLANS-RUBIÓ, 2012; BRICKS *et al.*, 2014).

Tendências comportamentais como aumento da urbanização e facilidade de viajar, facilitam a propagação da gripe. Em 2002, 52 milhões de pessoas embarcaram em vôo internacionais, demonstrando como vírus respiratórios se propagam rapidamente (ASKLING & ROMBO, 2010).

2.1.2 Manifestações clínicas

Em geral, a gripe se apresenta como uma infecção do trato respiratório superior, tendo como sintomas: quadro febril (temperatura $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), com a curva térmica usualmente declinando após dois ou três dias e normalizando em torno do sexto dia de evolução. Os demais sinais e sintomas são habitualmente de aparecimento súbito: calafrios, mal-estar, cefaleia, mialgia, dor de garganta, artralgia, prostração, rinorreia, tosse seca. Podem ainda estar presentes: diarreia,

vômito, fadiga, rouquidão e hiperemia conjuntival. As queixas respiratórias, com exceção da tosse, tornam-se mais evidentes com a progressão da doença e mantêm-se, em geral, por três a quatro dias após o desaparecimento da febre. A rouquidão e a linfadenopatia cervical são mais comuns em crianças. A tosse, a fadiga e o mal-estar frequentemente persistem pelo período de uma a duas semanas e, raramente, podem perdurar por mais de seis semanas (SESA-PR, 2014). A maioria das pessoas se recupera da enfermidade dentro de uma semana, sem a necessidade de atendimento médico. Porém, a gripe pode evoluir para SRAG, especialmente em pessoas com alto risco – crianças menores de 2 anos, gestantes, adultos com mais de 65 anos, indivíduos com doenças crônicas ou imunossuprimidas (NICHOLSON, 2010).

2.1.2.1 Síndrome gripal

É classificado como indivíduo em síndrome gripal (SG) aquele que apresente febre de início súbito, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e pelo menos um dos seguintes sintomas: cefaleia, mialgia ou artralgia, na ausência de outro diagnóstico específico. Em crianças com menos de dois anos de idade, considera-se também como caso de síndrome gripal: febre de início súbito (mesmo que referida) e sintomas respiratórios (tosse, coriza e obstrução nasal), na ausência de outro diagnóstico específico (SVS, 2015a).

2.1.2.2 Síndrome respiratória aguda grave

Segundo a OMS, 2014, é considerado portador de SRAG qualquer pessoa, de qualquer idade, internada com SG e que apresente dispneia ou saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente ou sinais de desconforto respiratório – aumento da frequência respiratória (de acordo com a idade), piora nas condições clínicas de base; hipotensão em relação à pressão arterial habitual; em crianças, além dos itens anteriormente citados, observar também os batimentos de asa de nariz, cianose, tiragem intercostal, desidratação e inapetência. O quadro clínico pode ou não ser acompanhado de alterações laboratoriais-leucocitose, leucopenia ou neutrofilia, e radiológicas como em radiografia de tórax com infiltrado intersticial localizado ou difuso ou presença de área de condensação.

A complicação da influenza que mais frequentemente leva à hospitalização e à morte é a pneumonia, que pode ser causada pelo próprio vírus ou por infecção bacteriana. Dependendo da virulência das cepas circulantes, o número de hospitalizações e mortes aumenta substancialmente, não apenas por infecção primária, mas também devido às infecções secundárias por bactérias. Complicações cardíacas graves que levam à morte podem ser causadas por vírus A e B, independentemente da presença de pneumonia (ALLARD *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2013; PADDOCK *et al.*, 2012).

Em adultos, a maioria das complicações e mortes ocorre em pessoas portadoras de doenças de base, enquanto em crianças menores de cinco anos de idade, a maioria das hospitalizações e quase metade das mortes ocorre em crianças previamente saudáveis, particularmente, no grupo menor de dois anos de idade (CARVALHANAS, *et al.* 2014).

Dentre os principais agentes etiológicos que resultam em SRAG, estão os vírus (influenza, vírus sincicial respiratório, adenovírus, hantavírus e coronavírus), e outros agentes (pneumococos, outras bactérias, *Legionella* sp., leptospirose, etc.). O diagnóstico de pneumonia viral é frequentemente de exclusão, baseado na ausência de produção de escarro, falha na identificação de bactérias em cultura e contagem normal ou discretamente elevada de leucócitos. As manifestações clínicas e radiológicas causadas pelo vírus influenza não são específicas. O diagnóstico diferencial inclui outros vírus e bactérias, incluindo vírus sincicial respiratório, coronavírus, parainfluenza, rinovírus, adenovírus e *Mycoplasma* sp. (OPS, 2009).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da gripe é o vírus influenza – vírus RNA de fita simples com polaridade negativa, envelopado, pleomórfico, geralmente esférico ou ovóide que apresenta um diâmetro de 80-120 nm (MURPHY & WEBSTER, 2001). Este vírus pertence à família *Orthomixiviridae* (van REGENMORTEL *et al.*, 2000); que é constituída de sete gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Thogotovirus*, *Isavirus* e *Quaranjavirus* (FAUQUET *et al.*, 2004). Desses, somente os gêneros *Influenza A*, *B* e *C* apresentam relevância clínica em

humanos (NOAH & KRUG, 2005) - o gênero *Thogotovirus* acomete carrapatos (HAGMAIER *et al.*, 2003) e os *Isavirus* são importantes patógenos na aquicultura marinha do salmão (KIBENGE, *et al.*, 2001).

Os vírus influenza estão disseminados em todas as partes do mundo. Os tipos A e B sofrem frequentes mutações e são responsáveis pelas epidemias sazonais, também por doenças respiratórias com duração de quatro a seis semanas e que, frequentemente, são associadas com o aumento das taxas de hospitalização e morte por pneumonia, especialmente em pacientes que apresentam condições e fatores de risco. O vírus C raramente causa doença grave (FIORE *et al.*, 2013).

A nomenclatura do vírus influenza foi instituída em 1971 pela OMS. O sistema especifica o gênero, o hospedeiro (para espécies animais), a localização geográfica do primeiro isolamento, o número da amostra e o ano do isolamento (WHO, 1980).

2.3 VÍRUS FLU B

Infecções por Flu B são em média 20 a 30% do total de incidência da gripe, mas pode passar de 50% dependendo da estação. O vírus do tipo B foi identificado pela primeira vez em 1939 e é menos mutagênico que o tipo A, acometendo principalmente crianças e idosos. Formam um grupo homogêneo que apenas iniciou a se divergir na década de 80 em duas linhagens geneticamente e antigenicamente distintas: B/Victoria/02/87-like e B/Yamagata/16/88-like (ROTA *et al.*, 1990).

Antes de 1985 havia apenas uma única linhagem de Flu B circulando globalmente. *Victoria* foi a linhagem predominante na maior parte do mundo até o final da década de 80 e parece ter surgido a partir de uma linhagem menor de Flu B na China em 1975, mas só foi isolada em outros países após 1985 (CHEN *et al.*, 2008) – figura 1.

Seguida da emergência da linhagem *Yamagata*, na década de 90, a prevalência de *Victoria* sucumbiu à nova linhagem, cocirculando apenas no leste Asiático com o subsequente ressurgimento da linhagem *Victoria* em 2001-2002. A partir de então, após consecutivos *drifts* antigênicos, as duas linhagens vêm

cocirculando com mudanças nos padrões de prevalência e distribuição geográfica (WRIGHT *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007).

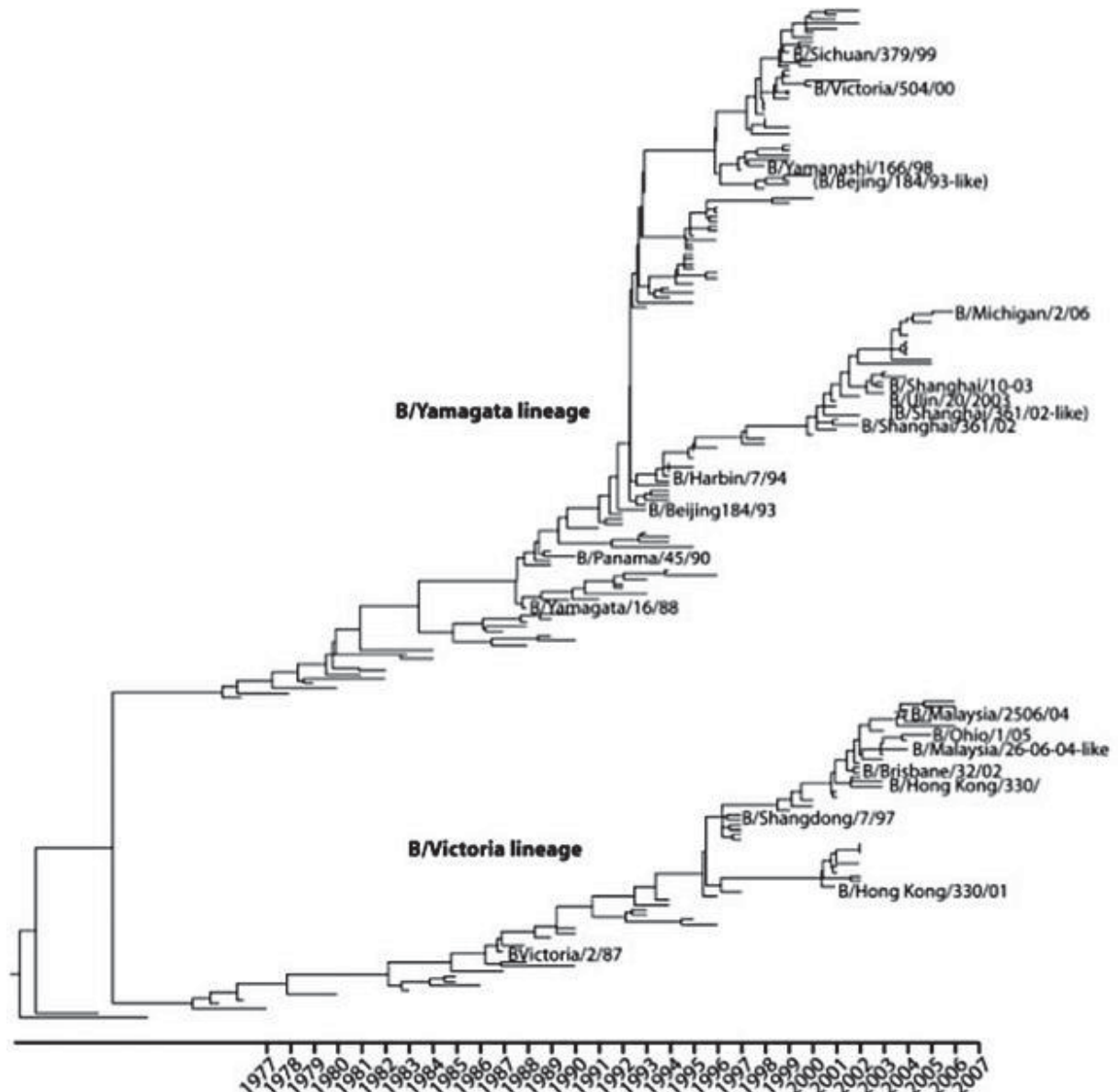


FIGURA 1 – EVOLUÇÃO DAS LINHAGENS ANTIGENICAMENTE DISTINTAS DE FLU B (1970-2006). ÁRVORE FILOGENÉTICA DO DOMÍNIO HA1 DO VÍRUS FLU B BASEADO EM 214 SEQUÊNCIAS DE AMOSTRAS ENTRE 1970 E 2006. REPRESENTANTES DE CEPAS VACINAIS TAMBÉM ESTÃO DEMONSTRADAS.
FONTE: CHEN *ET AL.*, 2008.

Alterações genéticas não são apenas importantes para vírus influenza A, são fatores cruciais na evolução dos vírus Flu B e têm sido responsáveis por recentes mudanças entre estes vírus. Uma divergência do gene da hemaglutinina (HA) no domínio HA1 é utilizada para diferenciar as linhagens de Flu B (WONG *et al.*, 2014). Em uma região de 13 pares de base, 6 nucleotídeos diferem as duas

linhagens. Estudos com pirogramas do gene hemaglutinina deste vírus também vem demonstrando que grande parte das linhagens representativas do vírus B/Vic contém o códon AAA na posição 531-533 enquanto que em linhagens representativas do vírus B/Yam há uma deleção deste códon (DENG *et al.*, 2013).

2.3.1 Organização genômica

O genoma do vírus Flu B é composto por 8 segmentos de RNA que codificam 11 proteínas (figura 2). Possui o maior genoma dentre os gêneros *Influenza* (14.634 nucleotídeos) e longas regiões não codificadoras (RACANIELLO & PALESE, 1979).

Os três primeiros segmentos codificam as polimerases: polimerase básica 2 (PB2), polimerase básica 1 (PB1) e polimerase ácida (PA). O quarto e o quinto segmento codificam HA e nucleoproteína (NP), respectivamente (RACANIELLO & PALESE, 1979). O sexto segmento possui duas origens abertas de leitura, responsáveis pela codificação das proteínas NB (proteína de canal) e NA (SHAW *et al.*, 1983). O sétimo segmento codifica a proteína de matriz M1 e a proteína de membrana BM2 – o código de terminação de um gene se sobrepõe ao códon de iniciação do outro formando um pentanucleotídeo de tradução de início e fim (IMAI *et al.*, 2004). O oitavo segmento de RNA codifica as proteínas não estruturais NS1 e NEP/NS2 através da ação de *splicing* do mRNA (RACANIELLO & PALESE, 1979).

A natureza fragmentada do material genético dos vírus influenza está associada a altas taxas de mutação durante a fase de replicação, em especial nos genes codificadores das glicoproteínas de superfície neuroaminidase NA e hemaglutinina HA. Estas mutações ocorrem de forma independente e habitualmente provocam o aparecimento de novas variantes para as quais a população ainda não apresenta imunidade (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

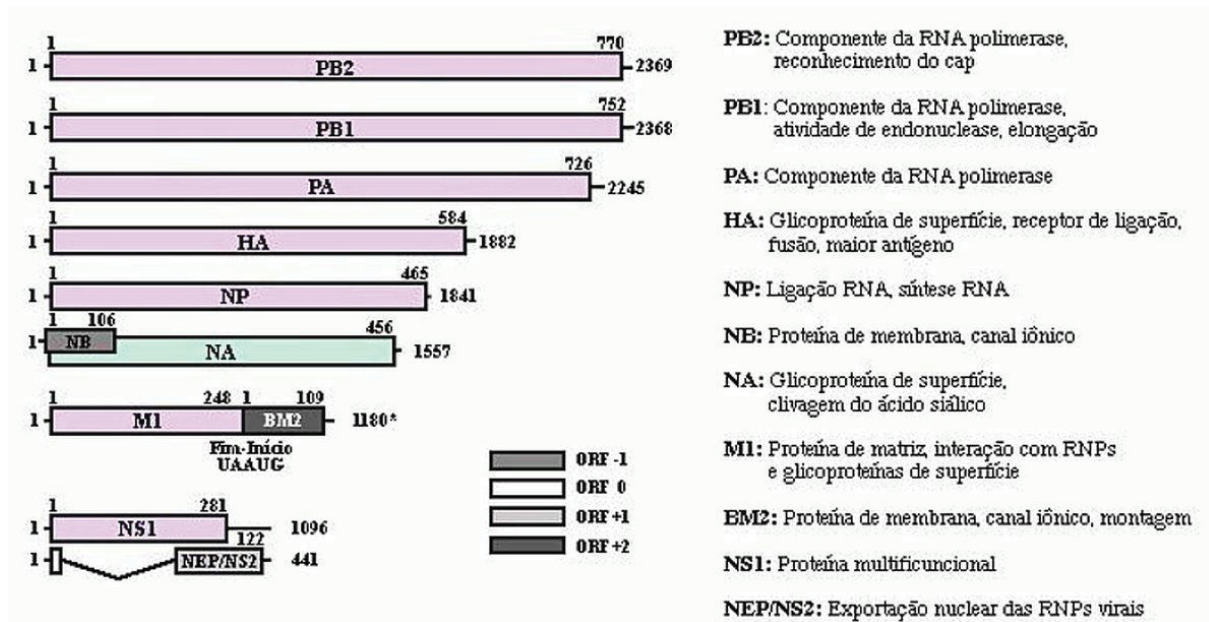


FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO GENOMA DO VÍRUS FLU B. CADA RETÂNGULO REPRESENTA UM SEGMENTO DE RNA.

FONTE: ADAPTADO DE FIELDS VIROLOGY, 5ª ED, CAP. 47.

2.3.2 Estrutura do vírus

A composição dos vírus influenza é de, em geral, 1% de RNA, 5 a 8% de carboidratos, 20% de lipídeos e aproximadamente 70% de proteínas (PALESE & SHAW, 2006). Estes vírus são envelopados por uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira. Possuem três proteínas ancoradas ao envelope: HA, NA e NB. Logo abaixo da membrana lipídica encontra-se a M1 e no interior da partícula viral há o complexo ribonucleoproteína (RNP) que consiste dos segmentos de RNA viral unidos a PB1, PB2, PA e NP, conforme ilustrado na figura 3 (COMPANS *et al.*, 1974; NODA *et al.*, 2006).

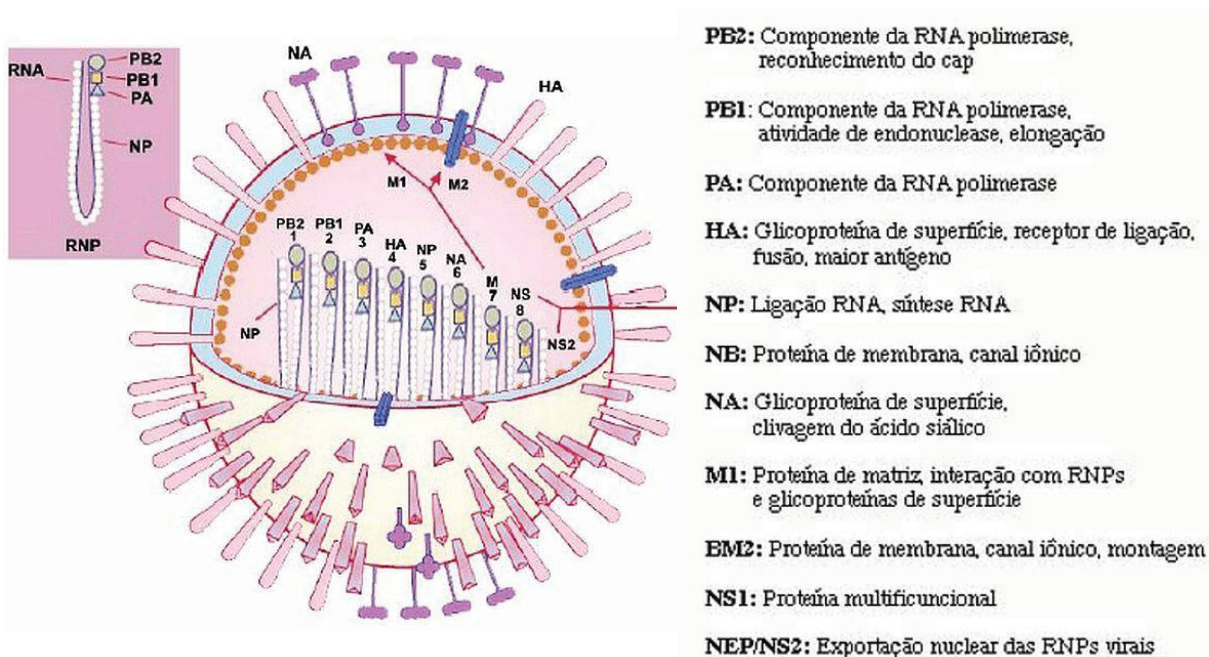


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA VIRAL DO VÍRUS INFLUENZA
 FONTE: ADAPTADO DE FIELDS VIROLOGY, 5ª ED, CAP. 47.

A HA, maior glicoproteína de superfície, é responsável pela adsorção dos vírus aos eritrócitos de várias espécies animais (HIRST, 1941) e aos receptores presentes em diferentes tipos de células susceptíveis – reconhecem as cadeias de açúcares da série sialil-lactose tipos I e II (ácido siálico) em glicoproteínas e glicolipídios nas células alvo como moléculas receptoras (SUZUKI *et al.*, 2005). É responsável também pela penetração do vírus através da membrana citoplasmática, intermediando a fusão do envelope da partícula endocitada com a membrana endossomal, resultando na liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma, além de constituir o principal antígeno, para o qual são dirigidos anticorpos neutralizantes protetores (WILEY *et al.*, 1981).

Independente de ser Flu A ou Flu B, inicialmente a HA é sintetizada como precursor (HA0) cuja clivagem proteolítica resulta em duas subunidades unidas por uma ligação dissulfeto (HA1 e HA2). Dependendo do subtipo da HA, o número de resíduos perdidos durante a clivagem proteolítica pode variar de 1 a 6. A subunidade HA1 corresponde à porção externa à membrana lipídica. A análise de variantes virais de HA1 possibilitou a identificação de cinco sítios antigênicos envolvidos na neutralização por anticorpos. Esses *locis* são os principais sítios de mutação, sendo as regiões de maior variabilidade da HA (WILEY *et al.*, 1981).

A segunda maior glicoproteína de membrana, neuraminidase (NA), é responsável pela clivagem do ácido siálico dos receptores celulares, sendo de

grande importância para a infecção viral, pois permite que os vírus formados consigam infectar novas células. Além disso esta proteína também previne que os novos virions não se agreguem. A degradação do ácido siálico do muco extracelular e a destruição dos receptores de hemaglutinina da superfície das células hospedeiras facilitam a infecção, impedindo que as partículas virais geradas no processo de replicação fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (COLMAN *et al.*, 1983). A NA pode também desempenhar um papel no início da infecção e não apenas na propagação da infecção como acreditava-se anteriormente (WEBSTER, 1970), podendo facilitar a entrada do vírus e, ou, intensificar o tráfico tardio do endossomo. Apesar da função da NA dos Flu B não ser idêntica à do Influenza A, os sítios ativos da proteína de ambos grupos são conservados, isto permite uma atividade de amplo espectro dos inibidores da NA (MATROSOVICH *et al.*, 2004).

Assim como a hemaglutinina, a neuraminidase tem propriedade antigênica e possui variantes. Juntas, essas proteínas são importantes imunógenos; logo, a proteção contra o vírus influenza está intimamente relacionada aos níveis de anticorpos contra HA e NA (KILBOURNE *et al.*, 2004).

2.4 VARIAÇÃO ANTIGÊNICA

Dois tipos de variações antigênicas são responsáveis pela habilidade dos vírus influenza causar epidemias sazonais recorrentes e pandemias ocasionais: desvios periódicos nas características antigênicas das glicoproteínas do envelope (*drifts* antigênicos) e deslocamentos mais extensos de seus segmentos genéticos - mudança genética em que um (ou mais) dos oito segmentos de genes são trocados entre distintos vírus (*shifts* antigênicos) (BEDFORD *et al.*, 2014).

Como os anticorpos são considerados a principal defesa contra a infecção por vírus influenza, as mutações em sítios de ligação do anticorpo - em particular as que se ligam ao receptor de HA ou NA – resultam em proteínas que são reconhecidas em menor grau pelo sistema imune humano, deixando os indivíduos susceptíveis às infecções (STRAY & PITTMAN, 2012).

As alterações antigênicas menores, os *drifts* antigênicos ocorrem em média a cada 5 ou 6 anos nos Flu B (COX & SUBBARAO, 1999). São responsáveis pela evolução gradual dos vírus influenza, originando novas estirpes dentro do mesmo subtipo e estão associados aos surtos epidêmicos da gripe sazonal. Estudos recentes demonstraram que uma mudança em apenas um sítio antigênico da hemaglutinina pode alterar sua estrutura de forma que origine uma variação antigênica. Nos tipos B e C não há subtipos, mas pequenas variações antigênicas na HA e NA têm sido descritas no tipo B. Este *drift* antigênico também explica por que as vacinas da gripe se tornam menos eficazes ao longo do tempo e precisam ser reformuladas a cada ano (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

Nos últimos anos, os vírus da gripe B evoluíram mais lentamente do que os vírus Flu A, evidenciado por uma taxa de substituição de nucleótidos estimada em $0,14 \times 10^3$ a $3,32 \times 10^3$ substituições / local / ano para Flu B vs. $2,68 \times 10^3$ a $12,50 \times 10^3$ em Flu A. A probabilidade de que as substituições resultem em alterações de aminoácidos também é menor para os vírus B em comparação com os vírus A. Entretanto, o rearranjo de segmentos entre os vírus Flu B é frequente, mecanismo pelo qual novos vírus B predominantemente surgem (LINDSTROM *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2008).

Os *shifts* antigênicos são alterações antigênicas drásticas mais frequentes de influenza A que alteram abruptamente a hemaglutinina (seguindo ou não de alteração de neuroaminidase) e estão associados com o aparecimento de novos subtipos e o risco de pandemias (NOAH & KRUG, 2005).

É possível observar que há uma correlação entre a variação antigênica e o número de novos casos de gripe por ano para cada estirpe de vírus. Isto sugere que saber quais fenótipos antigênicos estão presentes no início da temporada de gripe pode ajudar a prever quais cepas do vírus vão predominar no futuro. Desta maneira, um profundo conhecimento do processo de *drift* antigênico é essencial para saúde pública, possibilitando controlar a mortalidade e morbidade por meio do uso de uma vacina contra a gripe sazonal (BEDFORD *et al.*, 2014).

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Doenças respiratórias com sintomatologia semelhante à gripe podem ser causadas por uma gama de patógenos virais e não virais como parainfluenzavirus, adenovirus, vírus respiratório sincicial, rinovírus, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, entre outros, dificultando o diagnóstico clínico específico (CDC, 2010).

A confirmação laboratorial de influenza e o diagnóstico precoce são instrumentos importantes para o controle da propagação da doença e para a instituição do tratamento. As amostras de secreção nasofaríngea obtidas por *swab* combinado ou por aspirado nasal são os espécimes de primeira escolha, mas lavados bronco-alveolares também podem ser utilizados. Independente da amostra, ela deve ser coletada preferencialmente até 72 horas do início dos sintomas, já que após esse período a carga viral eliminada diminui (CDC, 2010).

Os diagnósticos de infecções virais do trato respiratório evoluíram de métodos baseados em cultura celular, para detecção de antígenos por imunoensaio e atualmente se baseiam em métodos moleculares. O cultivo celular, considerado "padrão ouro", apresenta alta especificidade, porém é um método demorado e tem baixa sensibilidade. Em vista disso, metodologias alternativas de diagnóstico mais rápido foram introduzidas gradualmente no diagnóstico laboratorial, como ensaios de imunofluorescência (IFI) e imunoenzimático (EIE), reação de hemaglutinação, inibição de hemaglutinação e métodos moleculares. No entanto, o cultivo celular se mantém como fundamental nos laboratórios de pesquisas e centros de vigilância epidemiológica, pois permitem a completa caracterização genotípica e fenotípica das cepas circulantes (HERRMANN *et al.*, 2001).

A reação de inibição de hemaglutinação foi muito utilizada para tipagem e subtipagem dos vírus influenza, mas com o desenvolvimento da biologia molecular, tem sido utilizada com menor frequência. A detecção de antígenos virais por métodos de IFI e EIE realizadas diretamente em amostras clínicas é utilizada desde 1970. Estes métodos possibilitaram aos laboratórios de virologia uma abordagem de detecção viral sem a necessidade do isolamento viral, além de uma liberação rápida dos resultados, porém deve-se ressaltar a variabilidade da sensibilidade destes métodos para os diferentes vírus. A IFI é uma técnica relativamente rápida (de 2 a 4

horas), apesar de apresentar sensibilidade variável, entre 40 a 97% (LELAND & GINOCCHIO, 2007). Os testes de diagnóstico rápido estão amplamente disponíveis e vêm aumentando nos últimos anos para triagem de Flu A e Flu B nos períodos epidêmicos. Alguns testes liberam resultado em até 15 minutos, entretanto, a sensibilidade e a especificidade variam entre 70-80% e 90-95%, respectivamente, quando comparado com o isolamento viral ou métodos de biologia molecular (CDC, 2010). Porém, como o tratamento antiviral para o vírus influenza deve ser administrado na fase inicial dos sintomas, até 48hs, a aplicação deste teste pode guiar a conduta médica em períodos de surto, além de possibilitar a aplicação de medidas preventivas (ÖZDEMİR *et al.*, 2012). Técnicas moleculares oferecem respostas mais rápidas com uma maior sensibilidade analítica e permitem a identificação de cepas que são difíceis de isolar por cultivo celular. Especialmente a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) *multiplex*, além de sensível e específica, é capaz de detectar simultaneamente um painel vários vírus (CHOA *et al.*, 2013).

No Brasil, grande parte dos laboratórios de vigilância epidemiológica ainda utilizam a técnica de IFI para o diagnóstico dos vírus respiratórios, por isso se torna difícil a comparação entre dados epidemiológicos entre os estados, pois a sensibilidade da tecnologia de biologia molecular é superior à IFI. Pioneiro na implantação da detecção molecular multiplex para a investigação epidemiológica de vírus respiratórios no Brasil, o Laboratório Central do Paraná (Lacen-PR) atualmente utiliza da tecnologia de qPCR para a identificação de 18 vírus respiratórios na vigilância epidemiológica estadual (SESA-PR, 2014) .

2.5.1 Métodos de diagnóstico por biologia molecular

As culturas celulares foram historicamente importantes para o desenvolvimento da virologia. Entretanto, desde o início de 2000, a detecção de vírus em amostras clínicas por meio do uso de métodos moleculares tornou-se amplamente disponível. A padronização de métodos moleculares para amplificação e detecção de ácidos nucleicos permitiu um aumento da sensibilidade, especificidade e velocidade na obtenção do diagnóstico de infecções virais

respiratórias. Estas características podem resolver as limitações associadas com as técnicas tradicionais de diagnóstico, como o cultivo celular e a detecção de antígenos virais, uma vez que, apesar de também requererem cuidado no transporte e armazenamento das amostras, não há a necessidade de preservar a viabilidade do vírus, sendo possível o congelamento das amostras. Outro ponto importante é a resposta sobre amostras negativas, à sensibilidade - capacidade de ter a certeza de resultados negativos - é um importante parâmetro do diagnóstico molecular que é bastante baixo nos ensaios de cultivo celular (ÖZDEMİR *et al.*, 2012).

Os testes de amplificação de ácido nucleico permitem a detecção de agentes virais patogênicos antes dos antígenos virais estarem presentes em quantidades suficientes para serem detectados e não necessitam de vírus viáveis. Ademais, os ácidos nucleicos são facilmente purificados e separados, o que nem sempre é o caso dos antígenos virais, cuja detecção pode ser inibida por complexos antígenos-anticorpos (LELAND & GINOCCHIO, 2007).

Muitas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos têm sido utilizadas para detectar vírus em amostras clínicas. Nos métodos mais tradicionais, como a PCR, a amplificação é seguida pela detecção de *amplicons* por eletroforese em gel. Mais recentemente, a utilização do diagnóstico por qPCR, em que amplificação e detecção são realizadas simultaneamente, sendo a detecção do ácido nucleico alvo continuamente monitorizado usando sondas fluorescentes intercalantes, sondas *TaqMan*®, ou sondas de transferência de energia de ressonância de fluorescência. O desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) superou várias limitações da PCR convencional e vem, desta maneira, substituindo-a no diagnóstico de rotina, pelo fato de ser realizado em um sistema fechado e não requerer manipulação de pós amplificação da amostra, o que reduz significativamente o risco de contaminação e elimina o passo demorado de detecção de produto de amplificação em gel de agarose. Além disso, os ensaios de PCR em tempo real mostraram sensibilidades equivalentes aos sistemas convencionais de PCR, porém uma especificidade maior (STRÁNSKÁ *et al.*, 2004).

Além dos ensaios moleculares oferecerem um tempo de execução reduzido, estes vêm sendo progressivamente “multiplexados” para detectar simultaneamente vários vírus diferentes num único ensaio, mantendo sensibilidade e especificidade (CHO *et al.*, 2014).

As desvantagens dos métodos de biologia molecular incluem: a incapacidade destes para distinguir entre o vírus viável e não viável, ou entre a doença e a infecção latente; a falta de padronização de alguns dos métodos, fazendo com que laboratórios relatem resultados discordantes com relatórios falso-negativos, assim como, a possibilidade de contaminação cruzada de amostras, criando resultados falsos positivos (LELAND & GINOCCHIO, 2007).

2.6 TRATAMENTO

. A terapêutica precoce reduz tanto os sintomas quanto a ocorrência de complicações da infecção pelos vírus da influenza. Desta forma, o uso do antiviral está indicado para todos os casos de síndrome gripal com condições e fatores de risco para complicações e casos de síndrome respiratória aguda grave, independentemente da situação vacinal. Nos pacientes com síndrome gripal sem condições e fatores de risco para complicações a indicação do antiviral deve basear-se em julgamento clínico. Por atuar inibindo a neuraminidase, para obter uma maior eficácia, recomenda-se que o tratamento seja iniciado nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas. No entanto, em formas graves, o antiviral pode trazer benefícios mesmo se administrado após 48 horas do início dos sintomas (SESA-PR, 2014).

Um limitado número de medicamentos antivirais estão disponíveis mundialmente para tratamento e profilaxia das infecções por influenza. Estes dividem-se em duas classes: inibidores de neuraminidase e inibidores do canal de prótons de proteínas de membrana.

Os inibidores de canal iônico de proteínas de membrana (adamantanos: amantadina e rimatidina) foram os primeiros fármacos desenvolvidos e são exclusivos na terapia de infecção por vírus influenza A.

Já os inibidores específicos de neuraminidase (peramivir, oseltamivir, zanamivir, laninamivir) são atualmente os únicos medicamentos antivirais eficazes licenciados para o tratamento das infecções causadas pelos vírus influenza A e B. Estes medicamentos agem impedindo a liberação do vírus das células infectadas por competir pelo local ativo da enzima viral neuraminidase com o ácido siálico - substrato natural encontrado sobre as proteínas da superfície de células

hospedeiras normais. Ao bloquear a atividade da enzima viral neuraminidase, estes inibidores previnem que novas partículas virais sejam liberadas pelas células infectadas (GUBAREVA *et al.*, 2001). Políticas de vigilância de medicamentos em diversos países aprovam principalmente o oseltamivir e, em menor escala, o zanamivir desde 1999. O uso do peramivir, que se trata de um medicamento que pode ser administrado por via parenteral, foi aprovado na Coréia, China e EUA (TAKASHITA *et al.*, 2015). Na pandemia de 2009 (propiciada pelo vírus influenza A/H1N1pdm) a OMS passou a recomendar como tratamento de primeira linha o medicamento oseltamivir, sob o nome comercial de Tamiflu®. Seu uso precoce nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas reduziu a duração da doença e de infecções bacterianas secundárias em adultos e crianças infectadas (WHO, 2010). Seu maior inconveniente é que a administração deve ser por via oral, o que pode comprometer a biodisponibilidade da droga em pacientes graves e em ventilação mecânica (TREANOR *et al.*, 2000).

A introdução de mutações na neuraminidase viral é a preocupação principal com a utilização continuada e abusiva de uma única classe de antivirais. Já há descrição de diversas mutações na neuroaminidase de Flu B relacionadas com uma resistência parcial ou total aos antivirais. As principais são E117G, D197N e a H237Y. Em um recente estudo que avaliou 2.915 amostras de Flu B em todo o mundo na temporada de influenza 2013-2014, Takashita e colaboradores (2015) encontraram 2% de resistência a um ou mais INA dentre as 604 linhagens B/Vic testadas e 0,34% de resistência a um ou mais INA dentre 2311 linhagens B/Yam. Em comparação com a temporada 2012-2013, a linhagem de influenza B/Yam manteve a mesma taxa de resistência, mas a linhagem B/Vic passou de 1% para 2% de resistência, o que os autores sugerem pode indicar uma tendência maior da linhagem B/Vic tolerar mutações que conferem resistência em sua neuroaminidase.

2.7 PROFILAXIA

A vacinação contra influenza é uma maneira eficaz de prevenir o adoecimento, as complicações e óbitos por gripe. Consequentemente, ela reduz o uso de medicamentos como antibióticos, os dias de trabalho perdidos e as

hospitalizações. Alguns estudos demonstram que a vacinação pode reduzir entre 32% a 45% o número de hospitalizações por pneumonias e de 39% a 75% a mortalidade global, sendo especialmente importante para as pessoas com maior risco de complicações graves da gripe e para as pessoas que vivem ou cuidam de indivíduos de alto risco (OSTERHOLM *et al.*, 2012).

A vacinação, embora não confira proteção completa nem proteção contra todas as causas de morte, previne aproximadamente 30% dos casos fatais e não fatais em idosos, 40% dos casos de SG e 50 a 70% das mortes em que o vírus influenza foi identificado em laboratório (MICHIELS *et al.*, 2011). Adicionalmente, existem evidências de que a vacinação reduz em pelo menos dois dias o tempo de hospitalização, um benefício substancial tanto do ponto de vista individual, quanto social (WANG *et al.*, 2004).

Existem diversas vacinas contra influenza que diferem quanto à sua composição (tipo e quantidade de antígenos, presença de adjuvantes e conservantes) e que podem ter diferentes indicações, de acordo com faixa etária (WHO, 2012).

O tipo de vacina contra influenza mais utilizada mundialmente é a vacina injetável de vírus inativado (subunidades ou *split* viral). Esta vacina pode ser administrada em crianças maiores que 6 meses de vida, grávidas ou pacientes com doença crônica e imunossuprimidos e pode ser composta de três ou quatro cepas de influenza (WHO, 2009).

As vacinas inativadas contra influenza são bastante seguras. A dor local é o evento adverso mais comum nos vacinados em comparação com os que receberam placebo, não sendo encontradas evidências de que as vacinas atualmente em uso causem eventos sistêmicos graves, como febre alta ou Síndrome de Guillain-Barré (FIORE *et al.*, 2013).

O pico máximo de anticorpos ocorre após 4 a 6 semanas, embora em idosos os níveis de anticorpos possam ser menores. Os níveis declinam com o tempo e se apresentam aproximadamente duas vezes menores em relação aos obtidos no pico máximo após seis meses da vacinação, podendo ser reduzidos mais rapidamente em alguns grupos populacionais, como indivíduos em sistema prisional, doentes renais, entre outros. A proteção conferida pela vacinação é de aproximadamente um ano, motivo pelo qual deve ser feita anualmente (WHO, 2012).

A imunogenicidade em crianças varia de 30 a 90% sendo diretamente proporcional à idade. Em crianças menores de seis anos de idade, aproximadamente 40 a 80% apresentam soroconversão após uma única dose da vacina, enquanto para crianças maiores de 6 anos, a taxa de soroconversão sobe para 70 a 100%. Mais de 50% das crianças menores de três anos e cerca de 30% das crianças até nove anos de idade são soronegativas para o vírus influenza após receber a primeira dose da vacina. Tal fato resulta na recomendação de duas doses da vacina influenza sazonal em primovacinados e uma dose nos anos subseqüentes (ZAMAN, *et al.*, 2008).

A vacinação contra o vírus influenza em gestantes é uma estratégia eficaz de proteção para a mãe e para o lactente. Estudos realizados com acompanhamento de bebês de mães vacinadas durante a gestação demonstraram que a proteção contra influenza confirmada por testes laboratoriais foi superior a 60% nos primeiros seis meses de vida. Além de proteger a mãe, a vacinação durante a gestação reduz o impacto da doença em bebês e o risco de hospitalização que é extremamente elevado nos primeiros meses de vida (ZAMAN, *et al.*, 2008).

Embora as vacinas sazonais sejam amplamente disponíveis e eficazes, a gripe representa uma grande ameaça para a saúde global, porque o *drift* antigênico inerente ao vírus influenza permite que o vírus escape da resposta imune dos indivíduos e consiga manter sua circulação anualmente. Devido a este *drift* antigênico e a relativamente baixa imunogenicidade das vacinas inativadas atualmente utilizadas em larga escala, se faz necessária a revacinação anual (NEIRYNCK *et al.*, 1999).

Vacinas universais contra influenza estão em desenvolvimento há mais de uma década, mas tem-se encontrado muitas dificuldades em materializá-las. Novas abordagens para a geração de uma vacina universal têm se concentrado em regiões altamente conservadas dos antígenos virais na expectativa de proporcionar ampla imunidade não só para os vírus sazonais, mas também para potenciais cepas pandêmicas de influenza que possam se espalhar rapidamente e causar alta mortalidade. Vacinas experimentais estão sendo desenvolvidas especificamente contra a proteína de membrana e uma região conservada da haste da HA, em que observou-se uma proteção ampla em modelos animais. Desta maneira espera-se que haja um mínimo *drift* antigênico anual do vírus de modo que fosse possível

eliminar a necessidade de redefinição anual da vacina da influenza (SCHOTSAERT *et al.*, 2013).

O Brasil iniciou a execução de uma política pública de vacinação de idosos contra influenza em 1999. Desde então, os grupos alvos da intervenção expandiram-se. A ampliação máxima ocorreu no ano de 2010 para o vírus pandêmico e por ocasião da campanha de vacinação contra a influenza pandêmica A(H1N1)pdm09, quando foram incluídos grupos de risco adicionais, mais de 89 milhões de pessoas foram vacinadas, correspondendo a uma cobertura vacinal de 47% da população brasileira (DOMINGUES *et al.*, 2010). Atualmente a recomendação de vacinação contra influenza do Ministério de Saúde é gratuita para crianças entre 6 meses e 5 anos de idade, gestantes e puérperas, idosos maiores que 60 anos, portadores de doenças crônicas, povos indígenas, comunidade carcerária, trabalhadores da saúde e professores (SVS, 2017).

As vacinas utilizadas nas campanhas nacionais de vacinação contra a influenza do Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil, são vacinas trivalentes que contêm os antígenos purificados de duas cepas de influenza A H1N1, um H3N2 e uma cepa de influenza B, embora duas linhagens antigenicamente distintas de Flu B co-circulem anualmente. Esta composição é anualmente determinada pela OMS para o hemisfério sul, de acordo com as informações da vigilância epidemiológica mundial (WHO, 2016).

Uma vez que a composição da vacina varia sazonalmente em função dos dados de vigilância global, a eficácia da vacina multivalente depende de quão bem as linhagens escolhidas coincidem com as que circulam na nova temporada. (NOAH & NOAH, 2013). Prever qual linhagem de Flu B predominará durante uma temporada é um desafio e a proteção cruzada por imunização contra a outra linhagem é inexistente (MCCULLERS *et al.*, 2004).

Por este motivo, nos EUA e grande parte da Europa, após diversos estudos que demonstraram discordância entre cepa de influenza B vacinal vs. circulante e o seu impacto na saúde pública, adotou-se a vacina quadrivalente, composta por dois subtipos de influenza A e as duas linhagens de Flu B (WHO, 2016).

No Brasil, segundo recomendação da OMS para a temporada de 2016 do hemisfério sul, a vacina influenza trivalente foi composta por cepas de *Myxovirus influenza* (fragmentado, inativado e purificado) correspondente aos antígenos HA equivalentes ao vírus similar ao Influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09; vírus

similar ao Influenza A/Hong Kong/4891/2014 (H3N2); vírus similar ao B/ Brisbane/60/2008 (linhagem Victoria) (SVS, 2015b).

Detentor do programa de vacinação nacional mais bem sucedido do mundo, tanto em diversidade de grupos contemplados gratuitamente pelo programa de vacinação quanto na cobertura vacinal atingida, o Brasil entre as temporadas de 2011 a 2016 atingiu mais de 80% de cobertura vacinal dentre os grupos prioritários conforme ilustrado na figura 4 (SVS, 2017), na Europa, a mediana de cobertura entre as temporadas de 2011 – 2013 foi de 47% variando entre 1% e 75%, sendo esta última concentrada apenas em idosos (Fig. 5) (ECDC, 2014) e nos EUA, a vacinação não atingiu 60% de cobertura entre as temporadas de 2009 a 2016 (Fig. 6) (CDC, 2016).

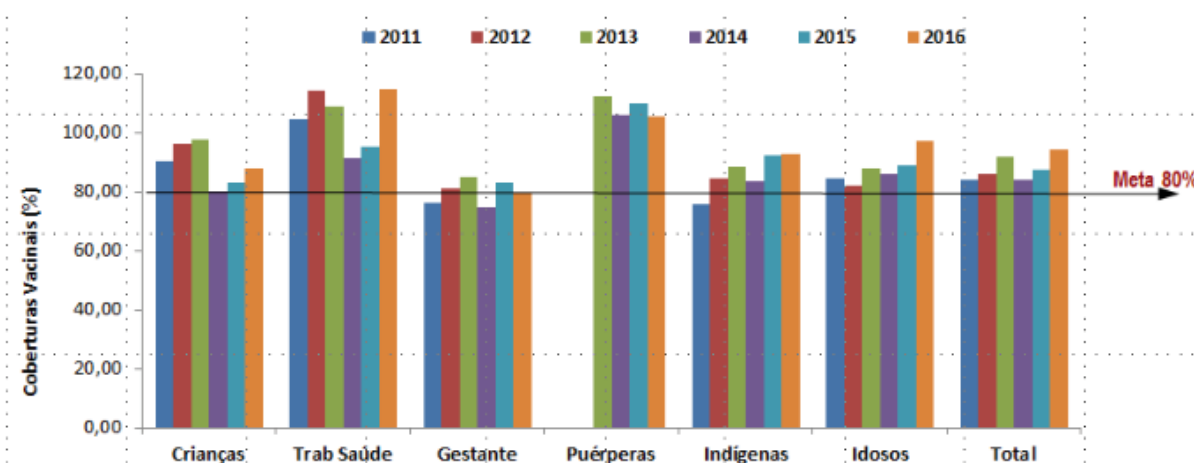


FIGURA 4 – COBERTURAS VACINAIS DA VACINA SAZONAL DE INFLUENZA POR GRUPOS PRIORITÁRIOS E ANO, BRASIL, 2011 A 2016.

FONTE: SVS, 2017.

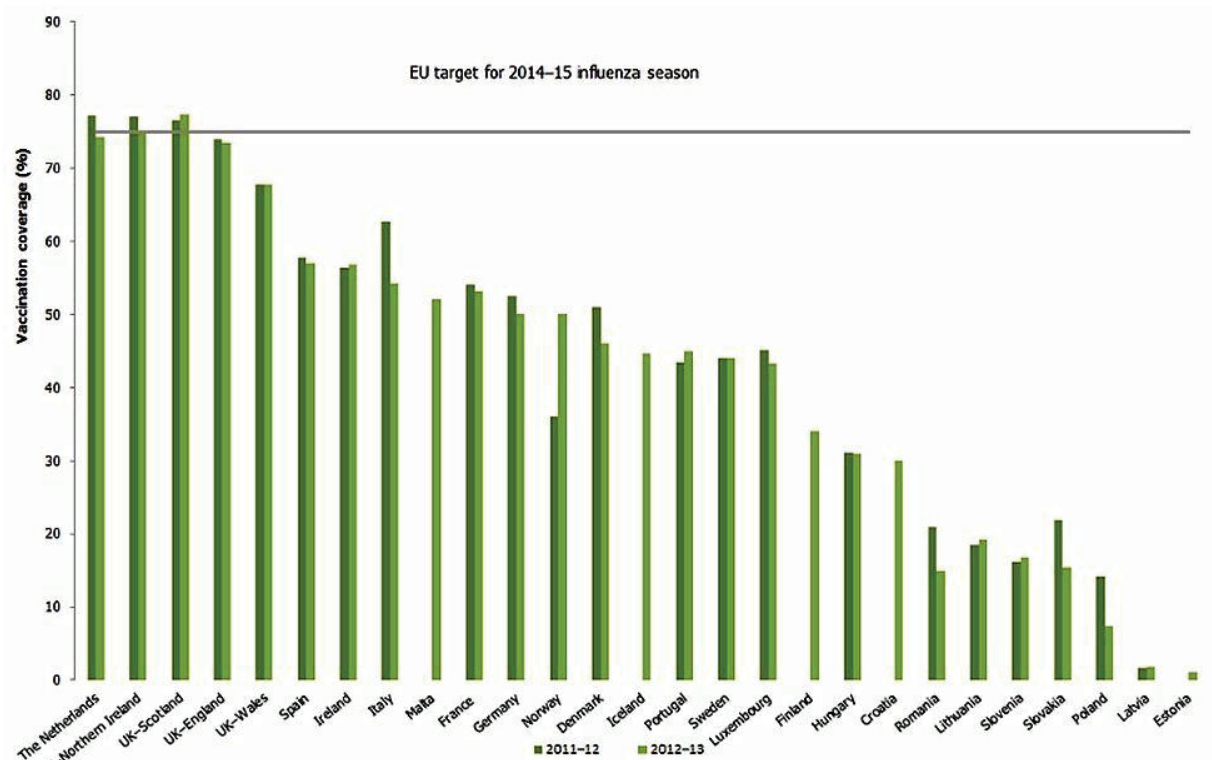


FIGURA 5 – TAXA DE COBERTURA DE VACINAÇÃO SAZONAL DE INFLUENZA EM IDOSOS > 65 ANOS DENTRE OS ESTADOS MEMBROS DA UNIÃO EUROPEIA, 2011 A 2013.
FONTE: ECDC, 2014.

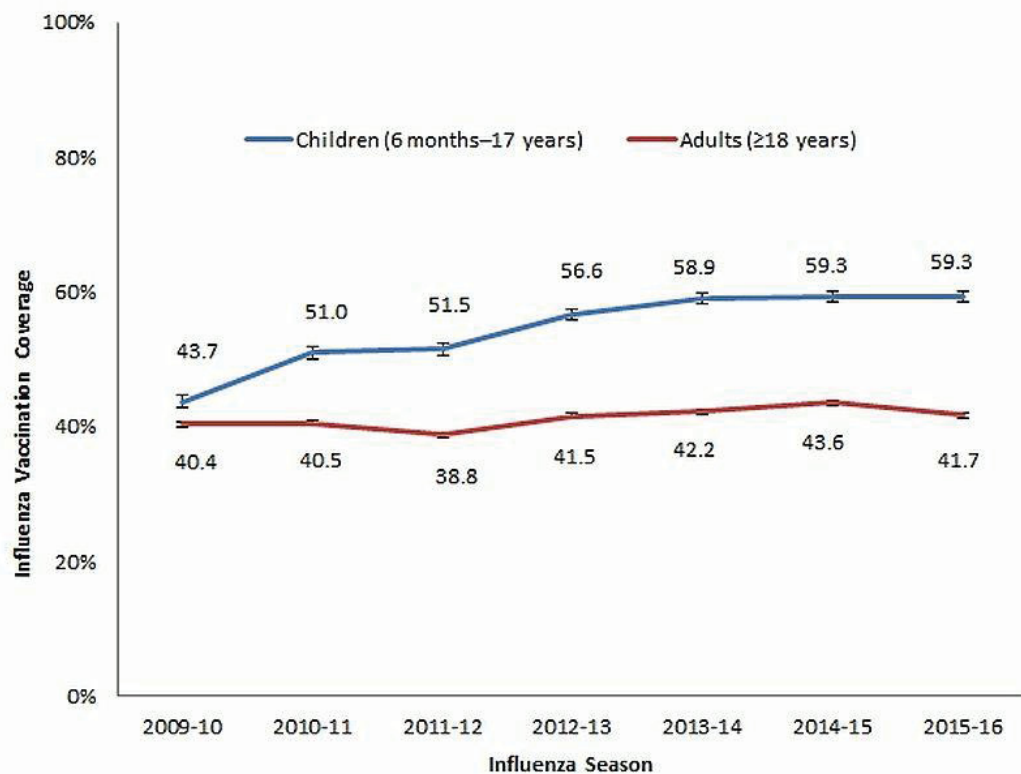


FIGURA 6 – COBERTURA DE VACINAÇÃO SAZONAL DE INFLUENZA POR FAIXA ETÁRIA E TEMPORADA, EUA, 2009 A 2016.
FONTE: CDC, 2016.

2.8 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

No Brasil, a rede de laboratórios de referência para vírus respiratórios é composta por três laboratórios credenciados como centros de referência para influenza junto à OMS, os quais fazem parte da rede global de vigilância da influenza. Entre estes laboratórios há um laboratório de referência nacional, situado na Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, e dois laboratórios de referência regional: o Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, e o Instituto Evandro Chagas, em Belém (SVS, 2016c).

Os laboratórios de referência para vírus respiratórios são responsáveis por realizar o controle de qualidade das amostras encaminhadas pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) de cada estado e dar suporte aos que ainda não realizam diagnóstico por biologia molecular. Os laboratórios de referência são também responsáveis pelas análises complementares dos vírus influenza, para conhecimento detalhado dos vírus circulantes no país a cada ano. Além disso, estão capacitados a realizar os testes para averiguar o desenvolvimento de resistência viral aos antivirais utilizados no país (SVS, 2016c).

O Ministério da Saúde (MS) iniciou em 2000 a implantação de um Sistema de Vigilância Epidemiológica da Influenza em âmbito nacional, incluindo a vigilância de SG em Unidades Sentinelas. O principal objetivo dessa vigilância era a identificação dos vírus respiratórios em circulação no país, além de permitir o monitoramento da demanda de atendimentos por SG, obtidos pelo Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe) (SVS, 2016c).

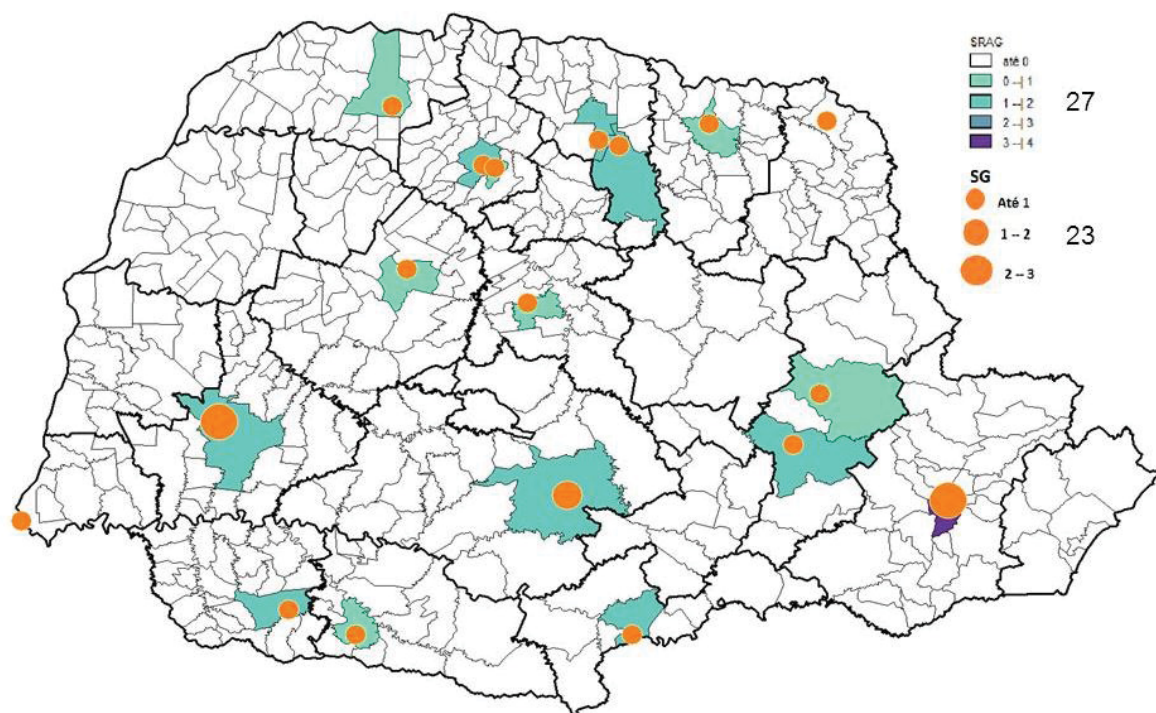
Em 2011 o MS iniciou um processo de reorganização e a ampliação da vigilância da influenza. Atualmente, a Rede Sentinela em influenza possui dois componentes: unidades de Vigilância de SRAG em unidades de terapia intensiva (UTI) e unidades de Vigilância de SG (SVS, 2016c).

A vigilância sentinela de SG é realizada em serviços de saúde com demanda espontânea (por exemplo: pronto - atendimento, emergência e ambatório). São ao todo 141 unidades no país. Para determinar a etiologia da SG, cada unidade sentinela deve coletar semanalmente 5 (cinco) amostras clínicas de secreção de nasofaringe dos casos que atendam a definição de caso de SG, de modo a atingir o mínimo de 80% (oitenta por cento) da coleta de material da meta semanal, com

oportuna digitação. Recomenda-se que seja realizado um processo sistemático de amostragem por conveniência, ou seja, as coletas devem ser realizadas ao longo da semana, evitando que fiquem concentradas em um único dia (SVS, 2015a).

Já o trabalho da vigilância sentinela de SRAG em UTI, ocorre em 111 serviços de saúde selecionados e visa a notificação e coleta de amostra respiratória de todos os casos que atendam à definição de SRAG internados em UTI dos hospitais sentinelas. Além do monitoramento de casos pelas unidades sentinelas, a vigilância da influenza também realiza notificação universal dos casos SRAG, através do sistema de informações de agravos e notificações (SVS, 2015b).

No Paraná, o Lacen conta com uma rede de 22 regionais de saúde que incluem um total de 51 unidades de coleta de amostras para investigação de vírus respiratórios da rede sentinela para vigilância epidemiológica do influenza, desta forma em torno de 36% dos dados sobre circulação de VR do Brasil são provenientes da rede de vigilância do estado do Paraná (figura 7).



Fonte: SVS/CEPI/DVVTR/SIVEP – Gripe. Dados atualizados em 06/04/2016.

FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES SENTINELAS (US) DE SG E SRAG/UTI DO SIVEP - GRIPE PARANÁ, 2016.
FONTE: SVS, 2016B

2.9 EPIDEMIOLOGIA

Não apenas a gripe pandêmica representa uma das maiores ameaças para a saúde global, mas também a sazonal. Durante os surtos sazonais ocorre um aumento significativo de consultas nos serviços primários de saúde e nas emergências. Além disso, a falta ao trabalho e as hospitalizações aumentam consideravelmente durante o período de sazonalidade do influenza, sendo que mais da metade das internações são em adultos maiores que 65 anos (NEUZIL *et al.*, 2002).

No hemisfério norte a sazonalidade de gripe ocorre entre novembro a março e no sul, entre maio e setembro. Alguns estudos sugerem que o clima pode influenciar a sobrevivência do vírus, como por exemplo, temperaturas baixas influenciarem a susceptibilidade do hospedeiro e aglomeração populacional. Em locais de clima tropical a epidemiologia do vírus influenza é diferente, podendo acontecer durante o ano todo, com picos após mudanças climáticas bruscas ou em períodos chuvosos (ALONSO *et al.*, 2007).

O estudo desenvolvido por Alonso *et al.* (2007) avaliou o comportamento sazonal da gripe em todas as regiões do Brasil, demonstrando um fenômeno de “onda” anual em direção ao sul, com início da circulação viral nas zonas equatoriais, com um intervalo de 3 meses entre os picos das regiões norte e sul do país. Conhecer este comportamento sobre a circulação deste vírus é fundamental para avaliar os distintos impactos da vacinação nas diferentes regiões do país.

A gripe ocorre globalmente a uma taxa de incidência anual estimada entre 5% a 10% nos adultos e 20% a 30 % em crianças. Pode resultar em hospitalização e morte, principalmente entre os grupos com fatores de risco. Em todo o mundo, calcula-se que as epidemias anuais resultem em cerca de 3 a 5 milhões de casos de doenças graves e cerca de 500.000 a um milhão de mortes por ano (WHO, 2009).

A incidência de Flu B pode variar drasticamente entre uma temporada e outra. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), de 2001 a 2011 – à exceção do período pandêmico em 2009 – Flu B foi responsável entre 1% e 44%, com uma média de 24% de positividade dentre as infecções por influenza. Na Europa, semelhantemente, a média de positividade de Flu B foi de 23% dentre as infecções por influenza variando entre 1% e 60% de um

ano para o outro durante o mesmo período avaliado (AMBROSE & LEVIN, 2012). De acordo com Caini e colaboradores (2015), Flu B é um vírus comum no século XXI, representando cerca de 20% de todos os casos notificados a centros nacionais de influenza em 26 países em todo o mundo durante 2000-2013.

Estudos sobre doença severa por influenza nos EUA mostraram que o vírus Flu B causa morbidade e mortalidade significativa. Entre as temporadas de 1979-2001, a taxa de hospitalização estimada nas estações dominadas pela gripe B foi de 81,4 hospitalizações por 100.000, maior do que a observada nas estações predominantemente A / H1N1 (55,9 por 100.000) (Thompson *et al.*, 2004).

Dados da vigilância epidemiológica dos EUA e da Europa sugerem um potencial aumento do impacto do vírus Flu B na saúde pública. Só nos EUA, Flu B foram responsáveis por 22 a 44% das mortes pediátricas anuais por influenza entre 2004-2011 - excluindo a temporada de 2009 (THOMPSON *et al.*, 2003). Em estudo global de Flu B realizado por Caini e colaboradores (2015) observou-se uma correlação inversamente proporcional entre casos de Flu B e casos de síndrome gripal tanto no hemisfério norte, sul como no cinturão intertropical.

No Brasil houve circulação do vírus Flu B em todas as temporadas entre 2006-2014, com uma frequência média de 20% dentre os casos de influenza, variando entre 1,0% a 42,6% (BARROS *et al.*, 2015). Entre 2013-2016 foram registrados 10.033 casos de SRAG, com uma taxa de 16% de óbito. Flu B foi responsável por 1.437 (14%) dos casos de SRAG e vem gradativamente aumentando seu impacto na saúde pública quando avaliado o percentual de mortalidade: 6% em 2013, 13% em 2014, 16% em 2015 e 8% em 2016 (SVS, 2014; SVS, 2015c, SVS, 2016a, SVS, 2016b).

Não há muitos estudos no Brasil a respeito da morbidade por influenza, porém há indicativos que infecções por influenza sejam responsáveis por 13% das hospitalizações de pacientes menores de cinco anos com bronquiolite e pneumonia (MOURA *et al.*, 2003; STRALIOTTO *et al.*, 2002). A incidência de infecções por vírus influenza em crianças em idade escolar é alta (15 a 42%), desta forma, as crianças têm um papel importante na introdução e disseminação do vírus na sua casa e comunidade (MUNOZ, 2003).

No Paraná entre 2013 e 2016 as infecções por Flu B foram responsáveis por 20% (496/2471) de casos confirmados de SRAG por influenza, variando entre 5% e

42%. Do total de pacientes infectados por Flu B neste mesmo período 6% (28/496) evoluíram para óbito (SVS, 2014; SVS, 2015c; SVS, 2016^a; SVS, 2016b).

3 JUSTIFICATIVA

Os vírus influenza são os únicos patógenos virais respiratórios, cuja prevenção pode ser através de imunização específica. A vacinação contra a gripe é mais eficaz quando os vírus circulantes coincidem com os vírus da vacina (OSTERHOLM *et al.*, 2012).

Devido às constantes mutações destes vírus, o Programa de Vigilância da Influenza da OMS e os Centros Nacionais de influenza em torno do mundo monitoram quais as variantes dos vírus influenza que circulam entre os humanos, com base nesta informação, determinam anualmente a composição da vacina anti-influenza que deverá ser formulada e disponibilizada no hemisfério norte e sul, medida necessária para controle das infecções anuais da gripe sazonal (NICHOLSON, 2010).

Variantes das duas linhagens de Flu B têm circulado concomitantemente. Como a vacina trivalente – recomendada pela OMS e aplicada pelo programa de saúde pública brasileiro – apenas é composta de uma cepa de Flu B, dados epidemiológicos atualizados que respondam sobre a caracterização molecular, prevalência e impacto destas linhagens de Flu B na comunidade são cruciais para a determinação da composição da vacina e correta imunização e assistência à população, para assim controlar esse grave problema de saúde pública.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente as linhagens dos vírus influenza B detectados em amostras clínicas humanas enviadas ao Laboratório de Virologia HC-UFPR e ao Laboratório Central do Paraná entre os anos 2000 e 2016.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar as linhagens Yamagata e Victoria de Flu B pela técnica de RT-qPCR utilizando o método MGB Taqman®.
- Avaliar a ocorrência de discordância entre a linhagem vacinal e a linhagem circulante e o impacto na saúde pública no respectivo ano.
- Caracterizar epidemiologicamente os pacientes infectados por Flu B entre os anos de 2000 e 2016.
- Comparar as características epidemiológicas e manifestações clínicas dos pacientes com infecções causadas por Flu B da linhagem Yamagata em relação à linhagem Victoria.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte do projeto “Síndrome respiratória aguda grave: epidemiologia molecular das infecções respiratórias virais e vigilância da emergência de variantes resistentes aos antivirais” que possui aprovação no Comitê de Ética, CAAE 18714013.4.0000.0096 20/08/2013 Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

5.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, analítico, de corte transversal, com coleta de dados retrospectivo e análise restrita aos anos de 2000 a 2016.

5.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

A pesquisa foi realizada com amostras clínicas de aspirado nasofaríngeo, lavado bronco alveolar ou *swab* nasofaríngeo positivas para Flu B armazenadas no laboratório de virologia do HC-UFPR e no LACEN-PR entre os anos de 2000 e 2016. A detecção do vírus Flu B foi realizada por RT-qPCR em ambos laboratórios. As amostras encontravam-se armazenadas em alíquotas de 1mL em tubo livre de RNA/DNases à temperatura de -80°C.

As amostras do HC-UFPR referem-se a pacientes internados, notificados com SRAG entre os anos de 2000 a 2016. Já as amostras do LACEN-PR referem-se a amostras do programa de vigilância epidemiológica de vírus respiratórios do estado do Paraná e incluem amostras de SG e SRAG. Devido ao volume de amostras recebidas pelo LACEN-PR, no período do estudo estavam armazenados em seu banco apenas amostras dos anos de 2013 a 2016, e mesmo assim grande parte das amostras de 2013 já haviam sido descartadas.

Foram investigadas no HC-UFPR 4.537 amostras para vírus respiratórios entre 2000 e 2016. Destas amostras, 276 eram positivas para influenza das quais 74 eram Flu B. O LACEN-PR, entre 2013 e 2016, investigou 34.338 amostras de vírus respiratórios, das quais 4.919 eram positivas para influenza, das quais 1.531 eram Flu B positivo (SRAG e SG). Considerando a prevalência de Flu B de 9% dentre as SRAG (de acordo com literatura), um nível de confiança de 95% e um erro amostral de 5% para obter um n amostral representativo da população estudada, 450 amostras foram selecionadas para o presente estudo: 71 do banco do HC-UFPR no período de 2000-2017 e 379 do banco do LACEN-PR no período de 2013-2017 (quadro 1).

Crítérios de inclusão: todas amostras de SRAG positivas para Flu B e amostras de SG pareadas por ano e regional de saúde.

Crítérios de exclusão: quantidade de amostra clínica insuficiente para a realização das metodologias.

QUADRO 1 – BANCO DE AMOSTRAS POR LABORATÓRIO.

Laboratório	Amostras de vírus respiratórios		Flu +	Flu B +	Amostras Selecionadas	
	SRAG	SG			SRAG	SG
HC-UFPR	4.537	0	276	74	71	0
LACEN-PR	17.507	16.831	4.919	1.531	193	186

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira etapa referiu-se ao levantamento das amostras armazenadas nos laboratório de virologia do HC-UFPR e do LACEN-PR e a verificação dos critérios de inclusão e exclusão. A segunda etapa, à caracterização dos vírus por métodos de biologia molecular. A terceira etapa, à revisão de prontuários e fichas de notificação de influenza para as análises demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com amostras caracterizadas na etapa anterior. O fluxograma de atividades está ilustrado na figura 8.

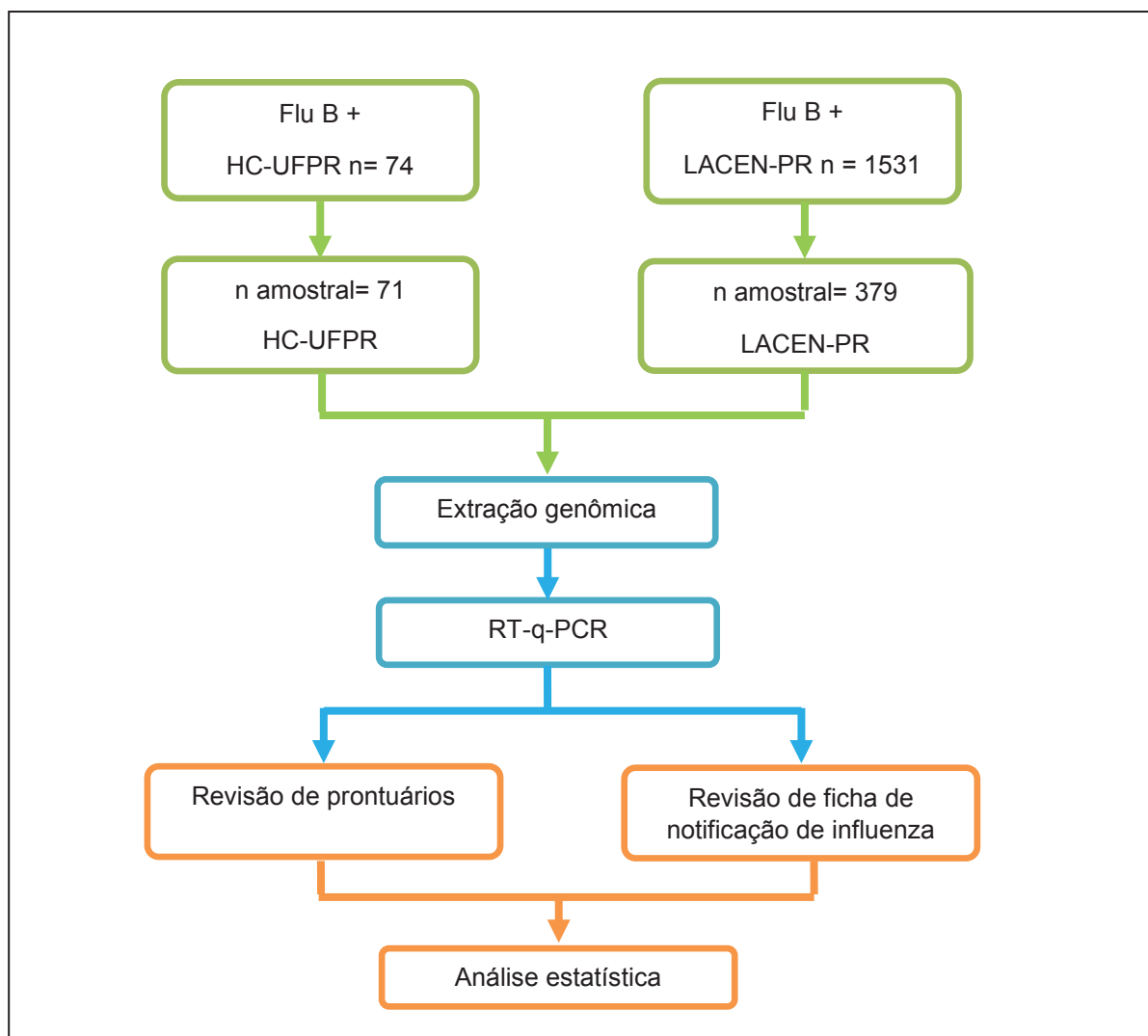


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES. ETAPA 1 EM VERDE, ETAPA 2 EM AZUL E ETAPA 3 EM LARANJA
 FONTE: O AUTOR (2016).

5.4 BIOLOGIA MOLECULAR

5.4.1 Extração genômica

O RNA viral foi extraído com o kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Inc) de acordo com as orientações do fabricante.

O kit utilizado baseia-se na tecnologia de extração e purificação por afinidade. As colunas contêm resina de sílica que promove a ligação seletiva de DNA/RNA dependendo da concentração de sal e outros fatores que são influenciados pelo método de extração. A extração do RNA é potencializada pelo

uso de um carreador – tRNA que tem a função de aumentar a ligação de ácidos nucleicos virais com a matriz de sílica e reduzir a degradação do ácido nucleico viral por nucleases presentes na amostra.

A lise da amostra se dá através do uso de um tampão de lise – que contém alta concentração de sais detergentes que quebram ligações de hidrogênio, interações de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas - em adição à enzima Proteinase K protease com função desnaturante. A precipitação é feita por redução de constante dielétrica causada pelo tampão de ligação. Os ácidos nucleicos são absorvidos na sílica, enquanto a maioria das moléculas passam através da coluna. A purificação do material é realizada por lavagens da coluna de sílica com tampão específico para a retirada de material orgânico como proteínas e nucleases que podem também se ligar inespecificamente à coluna. O RNA então é eluído em tampão de eluição.

A dosagem do material extraído foi realizada em espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop 2000c* utilizando 1µL do extraído para o parâmetro RNA, sendo considerada a leitura da relação de absorbância A260/280 entre 1,9 e 2,1 uma extração com alto nível de pureza oligonucleica.

5.4.2 PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR)

Para a discriminação das linhagens de Flu B, foi utilizado o método RT-qPCR *one-step* (obtenção de DNA complementar seguida da amplificação do alvo em tempo real em um mesmo protocolo) padronizado para o sistema *FAST* e tecnologia de sonda *TaqMan MGB*.

A escolha deste modelo de sonda justifica-se, pois a região diferencia a linhagem Victoria e a linhagem Yamagata possui apenas 13 nucleotídeos e até 6 mutações pontuais. A sonda *Minor Groove Binder* (Epoch Biosciences, Inc) é um sistema de detecção de fluorescência por hidrólise. Durante a fase inicial, devido a sua hidrofobicidade e à temperatura de desnaturação, esta sonda assume a forma randômica espiral que permite identificar alvos muito pequenos ou mutações pontuais. A fluorescência do corante *reporter* é silenciada pela proximidade do corante silenciador. Durante o anelamento, a sonda MGB se desdobra e pareia na região complementar do DNA alvo fazendo com que o corante silenciador seja

afastado do corante *reporter* e a fluorescência seja emitida. Durante a extensão a sonda é despareada.

Para a amplificação da região da hemaglutinina, utilizou-se um par de iniciadores: F432 (5'- ACCCTACARAMTTGGAACYTCAGG – 3') e R479 (5'- ACAGCCCAAGCCATTGTTG-3') e sondas específicas para cada linhagem marcadas com o fluoróforo VIC e FAM: B/Yam, MGB437 (5'- FAM– AATCCGMTYTTACTGGTAG–MGB-3') e B/Vic, MGB470 (5'- VIC– ATCCGTTTCCATTGGTAA–MGB-3') (BIERE *et al.*, 2010).

As condições de reação foram estabelecidas para um volume total de 25µL utilizando *TaqMan® One Step RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc) de acordo com a bula, 600nM do iniciador reverso R479, 150nM do iniciador senso F432, 150nM da sonda MGB437, 100nM da sonda MGB470 e 3µL de RNA. A amplificação foi realizada no equipamento *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (AB Applied Biosystems, Inc) programado nas condições de ciclagem: 50°C por 10min (RT-PCR), 95°C por 5min (ativação) seguido de 45 ciclos 95°C por 15s (desnaturação) e 60°C por 30s (hibridização). Curvas de amplificações com C_T acima de 44 foram desconsideradas na caracterização molecular.

5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes do HC-UFPR foram revisados a partir de prontuários médicos. Os dados das amostras do LACEN-PR foram obtidos das fichas de registro individual dos casos de SRAG (anexo 1) e SG (anexo 2).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram compilados utilizando o software JMP, versão 5.2.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e analisados utilizando GraphPad Prism versão 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). As características demográficas e

clínicas com distribuição normal e não normal foram apresentadas como médias \pm desvio padrão e medianas com intervalos interquartis (IIQ), respectivamente. As características clínicas e epidemiológicas de pacientes infectados com B/Vic e B/Yam foram comparadas utilizando Teste exato de Fisher, teste t independente ou teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney quando apropriado. Os valores de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (ICs) foram calculados para as variáveis incluídas. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Dentre as 450 amostras selecionadas para o estudo, 423 (94%) foram molecularmente caracterizadas: 63 amostras do HC-UFPR e 360 do LACEN-PR. Foram caracterizadas 51 (12%) amostras entre 2000 e 2012 (período que contém somente amostras de pacientes hospitalizados no HC-UFPR). A partir de 2013, 382 (88%) amostras foram caracterizadas: 111 (27%) amostras em 2013, 43 (10%) em 2014, 121 (28%) em 2015, e 98 (23%) em 2016 (tabela 1). As amostras de 2016 corresponderam até a semana epidemiológica (SE) 46 (mês novembro).

TABELA 1 – FREQUÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B POR ANO.

Banco de amostras	Ano	B/Vic n=220 (%)	B/Yam n=213 (%)	Total n=423
HC-UFPR	2000	0	2 (100)	2
	2001	0	8 (100)	8
	2002	2 (40)	3 (60)	5
	2003	4 (80)	1 (20)	5
	2004	1 (50)	1 (50)	2
	2005	0	0	0
	2006	2 (33)	4 (67)	6
	2007	0	0	0
	2008	5 (36)	9 (74)	14
	2009	0	2 (100)	2
	2010	1 (33)	2 (67)	3
	2011	0	0	0
	2012	3 (100)	0	3
HC-UFPR + LACEN-PR	2013	106 (95)	5 (5)	111
	2014	3 (7)	40 (93)	43
	2015	12 (10)	109 (90)	121
	2016	81 (83)	17 (17)	98

FONTE: O AUTOR (2016).

No período analisado, ambas as linhagens co-circularam, apresentando padrões de alternância de prevalência com uma frequência total de 51% de B/Vic e 49% de B/Yam. De acordo com a tabela 1, dentre 2013 e 2016 (período com maior significância amostral), o ano de 2014 apresentou o menor impacto das infecções por Flu B na população dentre as temporadas avaliadas. O número de casos desse ano foi baixo e em geral referiram-se à doença leve. Os anos com maior incidência de casos de Flu B foram 2013 (n=111) e 2015 (n=121). Entretanto, o primeiro apresentou maior impacto na saúde pública devido ao alto número de casos de SRAG (103/111), enquanto no segundo, apesar do alto número de infecções, houve prevalência de casos de síndrome gripal (78/121).

Também foi avaliada a distribuição de infecções por Flu B nas 22 regionais da saúde do estado do Paraná. De acordo com a temporada houve variações de prevalência no estado do Paraná, mas o que se observou foi que em anos com prevalência de B/Vic, esta se concentrou no noroeste do estado e nos anos de prevalência de B/Yam, esta se concentrou na região sudeste do estado. Portanto, em vista deste padrão foi possível compilar os dados e verificar que as frequências das linhagens foram significativamente diferentes nas regiões do estado ($p = 0,0070$), com uma concentração de casos de B/Vic no noroeste do estado (20%; 84/423). Nesta mesma região também foi observado um elevado número de doenças graves – do total de casos de SRAG no estado, 36% (66/184) localizaram-se nesta região com prevalência de B/Vic. Quando avaliado regionalmente (figura 9), verificou-se que B/Vic foi prevalente no noroeste do estado (67%; 84/125). Em contrapartida, B/Yam foi prevalente na região sudeste (60%; 46/77). Nas demais regiões a frequência dos casos de ambas as linhagens foi equivalente, não havendo diferença de prevalência entre elas.

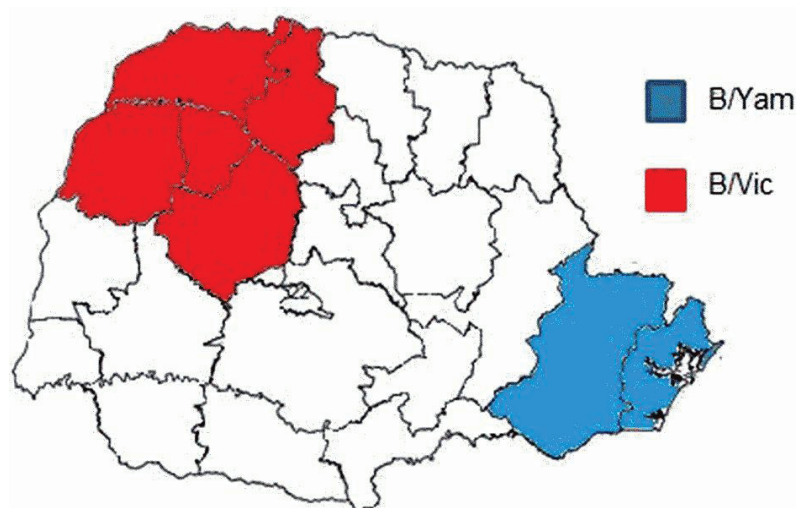


FIGURA 9 – PREVALÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B NO ESTADO DO PARANÁ NO PERÍODO DE 2013 E 2016.

AZUL PREVALÊNCIA DE B/YAM; VERMELHO PREVALÊNCIA DE B/VIC; EM BRANCO NÃO HOUVE PREVALÊNCIA.

FONTE: O AUTOR (2016)

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE LINHAGENS DE FLU B CIRCULANTE E VACINAL

Dentre as amostras avaliadas nas 17 temporadas de influenza, devido ao n amostral, apenas é possível avaliar concordância entre cepa vacinal e linhagem predominante na população entre as temporadas de 2013 e 2016. Dentre esse período foi observado discordância entre cepa vacinal e predominante na população no ano 2013. (figura 10)

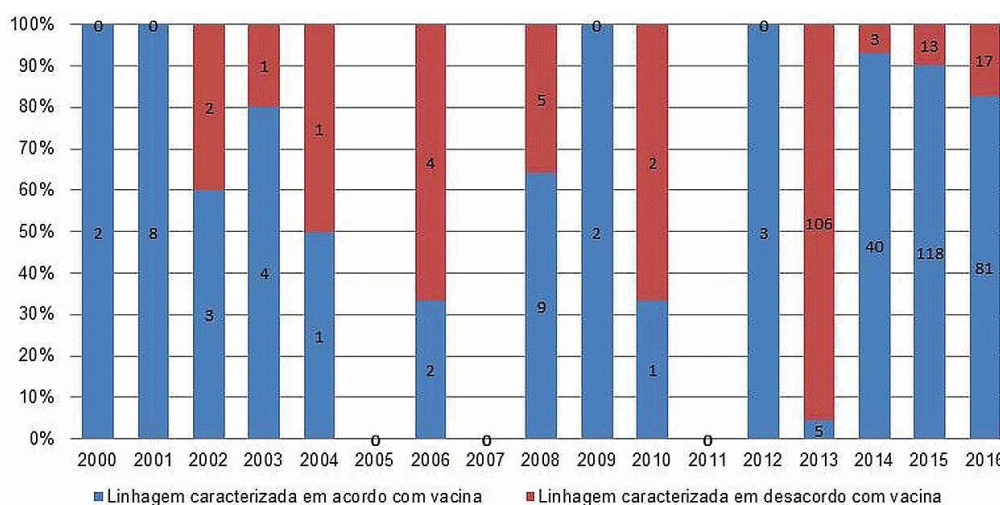


FIGURA 10 – CORRELAÇÃO ENTRE LINHAGEM CARACTERIZADA NA POPULAÇÃO E LINHAGEM VACINAL POR ANO.

FONTE: O AUTOR (2016).

Quando comparadas as temporadas a partir de 2013 (período em que se iniciam-se registros em literatura de circulação de linhagens de FluB no Brasil) verificou-se que em 2013, ano em que a linhagem circulante era B/Vic e a linhagem vacinal B/Yam, ocorreu maior incidência de casos de SRAG, enquanto que, nos anos em que houve concordância entre as linhagens vacinais e circulantes, foi observado um alto número de casos de SG (figura 11).

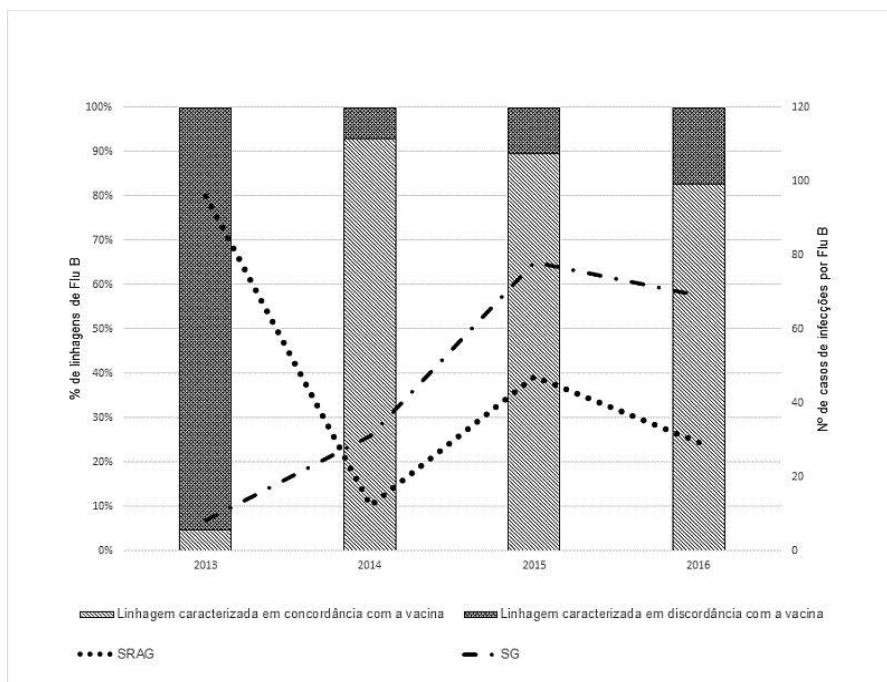


FIGURA 11 – FREQUÊNCIA DAS LINHAGENS DE FLU B NO ESTADO DO PR POR ANO ENTRE 2013 E 2016 RELACIONADO COM A GRAVIDADE DE DOENÇA. EIXO PRINCIPAL: PERCENTUAL DE LINHAGENS CARACTERIZADAS EM CONCORDÂNCIA E EM DISCORDÂNCIA COM A COMPOSIÇÃO VACINAL. EIXO SECUNDÁRIO: Nº DE CASOS DE INFECÇÃO POR FLU B. FONTE: O AUTOR (2016).

6.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

6.3.1 Sazonalidade

A avaliação da sazonalidade das infecções por Flu B demonstrou que a linhagem B/Yam tem concentração entre os meses de maio e setembro, com pico em julho, enquanto B/Vic, apresenta dois picos, um no período de baixas temperaturas, junho a agosto e um segundo entre setembro e novembro, período

em que, devido às altas temperaturas não é de se esperar taxas expressivas de infecções por influenza. O perfil de incidência de infecção por Flu B entre 2000 e 2016 está ilustrado na figura 12. Quando avaliado ano a ano o mesmo perfil foi observado.

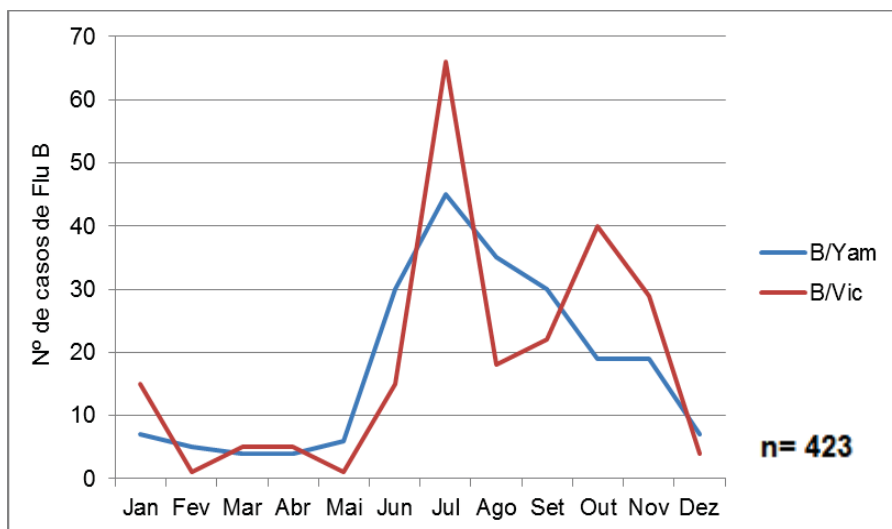


FIGURA 12 – DISTRIBUIÇÃO MENSAL DE CASOS DE FLU B/VIC E B/YAM ENTRE 2000 E 2016.
FONTE: O AUTOR (2016)

Quando comparado o perfil entre casos de SRAG e SG, percebe-se que os casos de SRAG possuem um pico no inverno, enquanto a distribuição dos casos de SG é difusa, mas também apresenta para infecções por B/Vic pico em outubro e novembro (figuras 13 e 14).

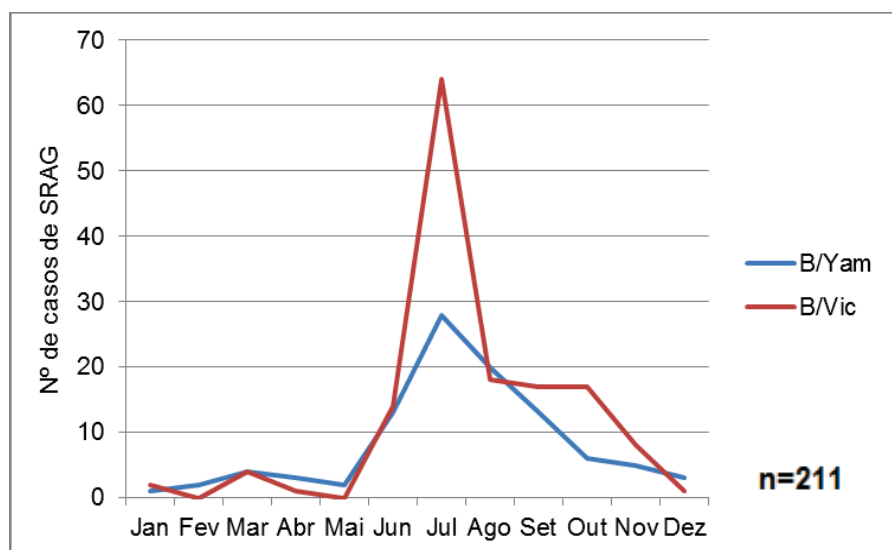


FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO MENSAL DE CASOS DE SRAG CAUSADOS POR FLU B/VIC E B/YAM ENTRE 2000 E 2016.
FONTE: O AUTOR (2016).

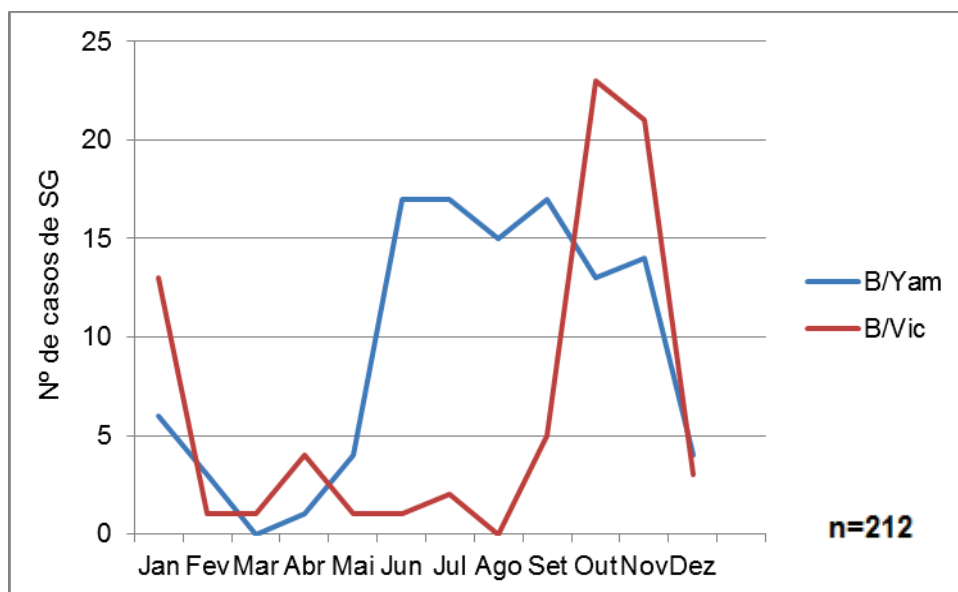


FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO MENSAL DE CASOS DE SG CAUSADOS POR FLU B/VIC E B/YAM ENTRE 2000 E 2016
 FONTE: O AUTOR (2016).

6.3.2 Características populacionais

O grupo mais afetado por infecções do vírus Flu B foram mulheres, adultas jovens, sem diferença de etnia e independente de apresentarem fatores de risco. Foram observadas diferenças nos padrões de infecção entre as duas linhagens, como demonstrado na tabela 2.

Nessa casuística, não foi encontrado nenhum caso de infecção em criança menor de 1 ano. A faixa etária entre 3 e 29 anos foi a mais afetada por infecções por Flu B (53%), mas esta característica etária foi mais evidente entre os casos de Flu B/Vic (64%) do que B/Yam (42%), sendo a mediana de idade dos pacientes infectados por B/Vic foi significativamente menor do que a dos pacientes infectados por B/Yam (23 anos IIQ; 11-35 vs 32 anos IIQ; 12-50, $p = 0,0247$).

Do total de infecções por Flu B, 61% eram pacientes do gênero feminino. Esta característica também foi preponderante em pacientes infectados por Flu B/Vic, foi observado que dentre os 220 pacientes infectados por B/Vic 71% eram do sexo feminino, enquanto que não foi observado diferença de gênero entre os pacientes infectados por B/Yam.

TABELA 2 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES DO ESTADO DO PARANÁ INFECTADOS PELO VÍRUS FLU B NO PERÍODO DE 2000 A 2016.

Características	Flu B n=423 (%)	B/Vic n= 220 (%)	B/Yam n=213 (%)	* Valor de p
Gênero				
Masculino	165 (39)	64 (29)	101 (52)	<0.0001
Feminino	258 (61)	156 (71)	112 (48)	
Mediana de idade	24; 12-42	23; 11-35	32; 12-50	0.0247
Grupo etário				
≤ 2	21 (5)	15 (7)	6 (3)	<0.0001
3-15	123 (29)	66 (30)	62 (29)	
16-29	101 (24)	75 (34)	28 (13)	
30-45	76 (18)	35 (16)	43 (20)	
46-60	55 (13)	16 (7)	38 (18)	
> 60	47 (11)	13 (6)	36 (17)	
Grupo étnico				
Afrodescendente	41 (11)	22 (11)	19 (11)	0.1386
Caucasiano	197 (53)	113 (58)	84 (48)	
NI	132 (36)	61 (31)	71 (41)	
Fator de risco informado				
Presença	80 (19)	37 (17)	47 (22)	0.1316
Ausência	102 (24)	60 (27)	43 (20)	
NI	241 (57)	123 (56)	123 (58)	

EM NEGRITO – VALORES ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS.

NI – NÃO INFORMADO NA FICHA DE NOTIFICAÇÃO. FONTE: O AUTOR (2016).

A infecção por Flu B foi prevalente entre o sexo feminino tanto em número total de casos, quanto no número de evoluções para doença grave (SRAG). No total, 60% das mulheres infectadas por Flu B apresentavam para doença grave, enquanto que, dentre os homens infectados por Flu B, apenas 29% pacientes apresentaram SRAG.

A mediana de idade das mulheres infectadas foi de 24 anos (IIQ 12-43). Das 258 mulheres deste estudo, 142 (62%) tinham notificação sobre fatores de risco. Somente 44 (19%) mulheres possuíam pelo menos um desses fatores, dentre elas apenas 5 estavam grávidas. Em 2013, ano em que houve discordância entre a composição vacinal e linhagem circulante, foi observado o maior número de casos de infecção em mulheres (104/228, 46%).

Não foi encontrada associação entre presença ou ausência ou fator de risco específico para as linhagens de vírus Flu B. Porém, em mais de 50% dos prontuários e fichas de notificação de influenza não havia informação a respeito. Os fatores de riscos descritos foram: crianças menores que 2 anos, adultos maiores que

60 anos, gestação, diabetes, doenças respiratórias crônicas, imunodepressão (transplantados e HIV positivo) e neoplasia.

6.4 DADOS CLÍNICOS

As fichas de notificação de SRAG e SG (anexo 1 e 2), ao contrário dos prontuários médicos, fornecem pouca informação a respeito de dados clínicos do paciente. Como 85% das informações dos pacientes vieram destas fichas de notificação, foi possível avaliar no estudo os seguintes critérios clínicos: sintomas, gravidade de doença, tempo de sintomas antes de intervenção médica e utilização de medicamento, como demonstrado na tabela 3.

TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES INFECTADOS POR FLU B ENTRE 2000 E 2016.

Características		Flu B n=423 (%)	B/Vic n=220 (%)	B/Yam n=213 (%)	*Valor de p
Severidade de doença					
SG		212 (50)	84 (38)	136 (64)	<0.0001
SRAG		211 (50)	136 (62)	77 (36)	
Sintomas					
Febre		190 (45)	119 (54)	72 (34)	<0.0001
Tosse		194 (46)	123 (56)	77 (36)	
Dor de garganta		123 (29)	79 (36)	45 (21)	
Mialgia		106 (25)	62 (28)	38 (18)	
Desconforto respiratório		72 (17)	68 (24)	21 (10)	
Outros		47 (11)	33 (15)	13 (6)	
NI		216 (51)	90 (41)	132 (62)	
Tempo de sintomas até intervenção médica					
Início de sintomas (Mediana, IIQ, dias)		3; 1-5	4; 2-5	2; 1-4	0.0005
Pacientes atendidos com ≤ 48hs de início de sintomas		173 (41)	75 (34)	106 (50)	0.0016
Pacientes atendidos com > 48hs de início de sintomas		250 (59)	145 (66)	107 (50)	
Tratamento com Oseltamivir no momento da notificação do caso					
SRAG	SIM	47 (11)	31 (14)	15 (7)	0.0010
	NÃO	93 (22)	65 (29)	28 (13)	
SG	SIM	8 (2)	1 (0)	8 (4)	
	NÃO	114 (27)	59 (27)	60 (28)	
NI		161 (38)	66 (30)	102 (48)	

EM NEGRITO – VALORES ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS. IIQ – INTERVALO INTERQUARTIL. NI – NÃO INFORMADO NA FICHA DE NOTIFICAÇÃO. FONTE: O AUTOR (2016).

Observou-se uma maior frequência de diagnósticos de SRAG entre pacientes infectados por B/Vic do que em pacientes infectados por B/Yam (62% vs. 36% respectivamente). Aqueles infectados pela linhagem B/Vic apresentaram maior risco de desenvolvimento de SRAG (OR 2,84; IC95% 1,86 a 4,34), já o oposto foi observado entre os pacientes infectados por B/Yam (OR 0,35; IC95% 0,23 a 0,54).

Os pacientes infectados pela linhagem B/Vic relataram mais sintomas gripais do que os pacientes infectados por B/Yam. Dentre os casos notificados, a frequência de febre e desconforto respiratório foi maior em pacientes B/Vic (92% e 52% respectivamente) do que em pacientes B/Yam (89% e 26% respectivamente). Dentre o campo outros sintomas foram citados: cólica abdominal, conjuntivite, coriza, diarreia, hipotensão, inapetência alimentar, rouquidão, sudorese, tontura e vômito, sendo este último o mais frequente entre os sintomas não clássicos, com uma frequência de 6% entre os pacientes.

A mediana de tempo entre início de sintomas e procura de serviço médico foi de 3 dias (IIQ 1-5), mas observou-se que pacientes infectados por B/Vic levaram o dobro do tempo para procurar atendimento médico em relação aos pacientes infectados por B/Yam (4 dias, 2-5 e 2 dias, 1-4; respectivamente).

Dentre os pacientes em que constava informação sobre tratamento no momento da notificação do caso, 18% dos casos de SRAG já estavam utilizando de Oseltamivir, dos quais 60% dos pacientes receberam o tratamento após 48hs de início de sintomas clínicos. Este início tardio da medicação foi mais frequente entre os doentes infectados com B/Vic do que as linhagens B/Yam (60% vs. 50%, $p=0,001$, respectivamente).

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Flu B comparado ao influenza A é um vírus mais homogêneo que causa menores taxas de infecção, apesar de ambos estarem associados com epidemias sazonais (AMBROSE & LEVIN, 2012).

Em uma escala global, vários estudos têm relatado sobre a elevada morbidade e mortalidade associada ao vírus Flu B entre os períodos pandêmicos, principalmente em épocas em que a sua circulação se equipara à circulação dos dois subtipos de influenza A, o que ressalta a necessidade de estudos mundiais que avaliem o impacto da doença causada por Flu B na população infectada.

Estudos de SRAG causados pelo vírus influenza nos EUA demonstraram números significantes de mortalidade e morbidade. A taxa de hospitalizações por Flu B entre 1979 e 2001 foi de 81,4 a cada 100.000 hospitalizações, enquanto de Flu A foi de 77,4 a cada 100.000. Entre o período de 1999 a 2001, Flu B foi responsável por 15% de todas as mortes por influenza naquele país. (THOMPSON *et al.*, 2003)

Entretanto, enquanto mundialmente 90% das amostras coletadas de influenza A são caracterizadas em seus subtipos, a caracterização de Flu B não passa de 10% de em suas respectivas linhagens (CAINI *et al.*, 2015).

Além disso, a caracterização das linhagens de Flu B é importante, pois a co-circulação de B/Vic e B/Yam possibilita o surgimento de novas linhagens a partir do rearranjo entre elas, como foi demonstrado em estudos recentes em Bangkok, Malásia e Tailândia que encontraram recombinações dos genes de HA e NA tanto em B/Vic quanto em B/Yam. Uma vez que o sistema de vigilância de influenza atualmente não contempla a avaliação do comportamento e evolução molecular das linhagens de Flu B a co-circulação destas linhagens se torna um risco eminente para a saúde pública mundial (TEWAWONG, *et al.*, 2015; OONG, *et al.*, 2015; HORTHONGKHAM, *et al.*, 2016).

No Brasil, apesar da vigilância das infecções por influenza ter sido implementada em 2000, os dados sobre a circulação de linhagens de Flu B são escassos e geralmente limitados a poucas temporadas. Barros e colaboradores

(2016) verificaram em um recente estudo de revisão sobre influenza no Brasil, entre os anos 2006 e 2016, em apenas 3 temporadas (2007, 2008 e 2013) há informações sobre a circulação das diferentes linhagens de Flu B.

No presente trabalho foi realizada a identificação das linhagens de Flu B - Yamagata e Victoria – de amostras de pacientes dos sistemas de vigilância sentinela de síndrome gripal e síndrome respiratória aguda grave em 17 temporadas consecutivas no estado do Paraná, com a finalidade de se estabelecer um estudo de epidemiologia molecular com um número de amostras substancial e em diversos contextos da circulação viral ao longo dos anos.

No total, o vírus Flu B correspondeu a 31% dos casos de influenza. Caini e colaboradores (2016) em estudo incluindo 26 países em todos os continentes reportou uma média de 22,6% (20-50%) de frequência de Flu B entre os casos de influenza entre 2000 e 2013. A média da frequência de Flu B encontrado dentre todas amostras de pacientes com SRAG (HC-UFPR e LACEN-PR) foi de 8,7% com variação entre 2% a 15% durante o período proposto para o estudo. Estes dados estão de acordo com relatórios da vigilância de influenza europeia que reportam 9,5% de casos de SRAG por Flu B na população e 47% de incidência de Flu B entre os casos de influenza (PUBLIC HEALTH ENGLAND 2014; 2015; 2016).

Estudos nacionais e internacionais dos últimos 10 anos demonstram que Flu B/Vic e B/Yam co-circulam frequentemente e que as recomendações da OMS de uma ou outra linhagem para a composição vacinal estavam corretas em apenas 50% dos casos durante um período de 10 temporadas (BELSHE *et al.*, 2010; AMBROSE & LEVIN, 2012; PAIVA *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2016; PEROSA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013), demonstrando que a ocorrência de discordâncias entre a linhagem vacinal e linhagem predominante na população é imprevisível.

Demonstrou-se no presente estudo a ocorrência de discordância entre linhagem vacinal e linhagem prevalente na população do Paraná avaliada nos anos de 2006 e 2013. No Brasil, níveis importantes de discordância entre linhagem vacinal e circulante foram descritos em cinco temporadas entre 2000 e 2016: 2000, 2005, 2008, 2010 e 2013 (OLIVEIRA, *et al.*, 2013; PEROSA *et al.*, 2015). Um estudo de Paiva e colaboradores (2013) relatou que dentre as diferentes regiões do Brasil, em 2013, 16% de vírus influenza identificados nas unidades sentinelas de vigilância de influenza corresponderam à linhagem B/Vic enquanto o restante de casos eram influenza A. Entre os casos de influenza B de 2013, o estudo de Barros e

colaboradores (2016) descreve uma alta taxa de discordância entre a linhagem vacinal e a linhagem circulante no ano de 2013 no Brasil - 91,4% dos casos de Flu B – e na América do Sul – 52% dos casos de Flu B.

Estudos têm demonstrado que mesmo com uma discordância parcial de linhagem vacinal e circulante ao longo dos anos, a morbidade e a mortalidade são substanciais no âmbito da saúde pública (AMBROSE & LEVIN, 2012; REED *et al.*, 2012). Lo e colaboradores (2013) observaram em um estudo em Taiwan que em 2012 66,9% de mortes foram por Flu B sendo 87,2% de linhagem oposta à linhagem contemplada na vacina daquele ano.

Um estudo de vigilância realizado na Finlândia entre 1999 e 2012 mostrou que o antígeno da vacina para a linhagem B não correspondia ao vírus circulante predominante em 10,8% das infecções totais de influenza e que adolescentes entre 10-14 anos apresentaram um risco maior de serem infectados (16,8%) enquanto idosos apresentaram o menor risco de serem infectados pelo vírus Flu B (HEIKKINEN *et al.*, 2014). Uma implicação desses resultados, de acordo com Baguelin e colaboradores (2013) é que adolescentes e adultos jovens podem ser os mais beneficiados pela adição de uma segunda linhagem de Flu B à vacina, resultando em benefício adicional de imunidade de rebanho.

Dentre os 761 casos de Flu B no estado do Paraná em 2013 (um dos anos de discordância entre linhagem vacinal e linhagem circulante), 46% corresponderam a casos de doença grave (SESA-PR, 2013). Já nos anos em que a composição vacinal coincidiu com a linhagem prevalente, o número de casos SG foi superior aos casos de SRAG, nestes anos os casos de SG representaram o dobro do número de casos de SRAG. Estes resultados demonstram o impacto na saúde pública resultante de uma cobertura de imunização inadequada.

Uma vez que a vacina quadrivalente contra influenza está disponível mundialmente, é importante que sejam feitas avaliações locais dos benefícios derivados da adoção de uma nova estratégia de vacinação, bem como da definição das melhores populações-alvo.

Com base no impacto do Flu B na saúde pública e a limitada ou inexistente proteção cruzada entre as duas linhagens de Flu B associada à imprecisão das estimativas da prevalência das linhagens em cada temporada, deve ser considerada a inclusão de uma segunda linhagem de Flu B na composição da vacinal sazonal de influenza do Brasil. A justificativa para a mudança de uma vacina trivalente para a

quadrivalente é semelhante à da transição em 1977 de uma vacina de Flu Bivalente (A/H3N2 e B) para uma trivalente (A/H3N2, A/H1N1 e B), mediante esta que se baseou na falta de proteção cruzada entre os subtipos de influenza A.

O CDC realizou recentemente uma análise buscando quantificar o potencial impacto na saúde pública americana de uma estratégia de vacinação contra a gripe quadrivalente em comparação a trivalente e verificou que em 2012 a adoção de uma vacina quadrivalente resultaria em 970.000 casos a menos de gripe, com uma redução de 8.200 hospitalizações e de 485 casos de óbitos por Flu B (REED *et al.*, 2012).

No Brasil não há a estimativa do benefício na adoção de uma vacina quadrivalente na campanha anual do Ministério da Saúde, mas as evidências observadas no presente estudo de que a inversão entre prevalência de doença grave e leve ocorre em anos de cobertura de vacinação eficaz indicam o grande benefício em mudar a estratégia de vacinação.

Fora a discordância encontrada entre a linhagem vacinal e a circulante verificada em duas temporadas de influenza, observou-se também que a distribuição das linhagens B/Vic e B/Yam foi desigual no estado do Paraná. Uma teoria para esse dado é o padrão distinto de circulação de linhagem nas fronteiras estaduais: ao norte (estado de São Paulo) e ao sul (estado de Santa Catarina).

Encontra-se na literatura que os estados do norte do Brasil sofrem grande influência do vírus circulante na América do Norte. Um estudo desenvolvido por Alonso e colaboradores (2007) avaliou o padrão sazonal de gripe em todas as regiões do Brasil, demonstrando um fenômeno anual de "onda" para o sul, com início da circulação viral em zonas equatoriais com intervalo de 3 meses entre os picos das regiões setentrionais e sul do país. A reintrodução do B/Vic no norte do estado poderia explicar o elevado número de casos SRAG em uma área cujas altas temperaturas não deveriam concentrar tantos casos de gripe e casos de SRAG.

Infelizmente, não existem dados substanciais sobre epidemiologia molecular no estado de Santa Catarina para avaliar este parâmetro visto não haver unidades sentinelas no interior do estado no período estudado. Em São Paulo um estudo realizado no estado a partir de pacientes internados em hospital terciário verificou que a linhagem B/Yam foi prevalente entre os anos 2008-2010 e a reinserção de B/Vic ocorreu apenas em 2011, se mantendo prevalente naquele estado até 2013, ano em que 100% das amostras caracterizadas no estudo foram B/Vic (PEROSA *et*

al., 2015). Contudo, não há registro em literatura de estudos que avaliaram diferenças entre a circulação das linhagens em diversas regiões de um mesmo estado brasileiro para comparar com os dados encontrados no PR.

De acordo com estudos anteriores (ALONSO *et al.*, 2008; VIDAL, *et al.*, 2008) foi observado um padrão de distribuição de casos de SRAG com uma alta concentração de infecções entre os meses de maio a setembro – período de temperaturas mais baixas no sul do país.

Em relação ao clima, no presente estudo casos de SRAG foram prevalentes na região noroeste do Paraná com maior média de temperatura (SIMEPAR, 2016), dado este que está em discordância com a associação de concentração de casos de influenza e temperaturas baixas relatado na literatura (VIDAL *et al.*, 2008). Contudo, como foi nesta região do PR que houve predominância de Flu B/Vic, talvez a justificativa possa ser o comportamento específico desta linhagem em relação ao clima. Estudos que incluam análises de um maior número de temporadas de infecção por linhagens de influenza B e que incluam avaliações climáticas devem ser realizados para que tais dados possam ser avaliados com maior precisão.

Apesar de no presente estudo observada uma concentração de casos de SRAG no inverno, não foi encontrada correlação direta entre temperaturas baixas e infecções por Flu B, uma vez que foram observados casos de SRAG e SG principalmente por B/Vic em número significativo nos meses de setembro a novembro. A distribuição dos casos de SG por Flu B se mostrou difusa, mas apresentou uma diferença de padrão, vírus B/Yam foram identificados mais precocemente e a partir de setembro houve uma inversão de prevalência para a linhagem B/Vic.

7.2 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Tendo em vista que o objetivo proposto pelo programa nacional de imunização para a vacina contra influenza é reduzir as complicações, as internações e a mortalidade decorrentes das infecções pelo vírus da influenza na população alvo para a vacinação, o período de vacinação nacional deveria ocorrer anualmente entre meados de março e início de abril, devido ao tempo médio de 30 dias para

soroconversão. Entretanto, o que se tem presenciado nos últimos anos é um início campanha de vacinação tardia. Entre o período de 2013 a 2016, em média, a vacinação teve início na última semana de abril com término na 3ª semana de maio (SVS, 2016c).

Embora estudos sobre infecções respiratórias apontem para uma concentração de casos em crianças menores de cinco anos, a idade de infecção em cada país está diretamente relacionada com a linhagem circulante, composição vacinal e cobertura vacinal.

No presente estudo foi observada prevalência de infecção por Flu B em crianças acima de cinco anos e adolescentes. Em estudo sorológico de crianças europeias de 0 a 7 anos de idade, foi demonstrado que as crianças acumulam imunidade ao Flu B mais lentamente do que ao influenza A (BODEWES *et al.*, 2011), possivelmente pela maior prevalência ou exposição ao Flu B em faixas etárias mais velhas do que as infectadas pelo influenza A.

Em geral, os estudos relatam prevalência de infecção de Flu B em idades escolares (3-15 anos) (HORTHONGKHAM *et al.*, 2016; BARR *et al.*, 2016). Entretanto alguns estudos recentes vêm demonstrando o impacto da infecção por Flu B em diferentes faixas etárias. Barros e colaboradores (2016), similarmente ao observado no presente estudo, reportaram prevalência de infecção de faixa etária entre 5-29 anos, com maior proporção de infecção em crianças de 5 a 9 anos e adolescentes de 10 a 19 anos. Na Inglaterra, durante a temporada 2015-2016 uma grande proporção de adultos jovens (faixa etária entre 15 a 44 anos) foram infectados por Flu B em comparação com a temporada de 2014-2015 em que a maioria das infecções por Flu B se estabeleceu em maiores de 65 anos (AMBROSE & LEVIN, 2012).

Comparando a mediana de idade entre as linhagens de Flu B observou-se que os pacientes infectados por B/Vic são mais novos do que os infectados por B/Yam. Esta diferença de faixa etária infectada entre as linhagens já havia sido reportada previamente em estudos realizados na Austrália, Hong Kong e Slovenia (BARR *et al.*, 2016; SOCAN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015). No estudo de Hong Kong publicado em 2015, além da diferença na faixa etária entre as linhagens, também demonstrou que menores de 15 anos tinham 13 vezes mais risco de desenvolver uma infecção secundária ao influenza quando infectados pela linhagem B/Vic do que pela linhagem B/Yam (XU *et al.*, 2015).

A reintrodução da linhagem B/Vic no Brasil é um dos fatores que podem ter influenciado para que esta linhagem tenha sido mais frequente em faixa etária mais jovem do que a linhagem B/Yam. Nos EUA, quando B/Vic foi reintroduzida em 2002 produziu uma série de intensas epidemias comunitárias que se estendeu do nordeste do país para o centro do Texas. As altas taxas de infecção por B/Vic em escolares demonstraram a falta de proteção cruzada oferecida por B/Yam, uma vez que crianças com menos de 12 anos não tiveram exposição a B/Vic anteriormente (GLEZEN *et al.*, 2013).

Entretanto, apenas a reintrodução de uma linhagem não é razão suficiente para elucidar essa questão, já que a diferença de faixa etária infectada entre as linhagens está sendo descrita em diversos estudos atuais. Vijaykrishna e colaboradores (2015) sugeriram que essa diferença de idade se deva a união de fatores verificados em seu estudo: diferença de especificidade entre os receptores de B/Vic e B/Yam e diferentes densidades de receptores para Flu B de acordo com a idade. Outra hipótese a se considerar baseia-se nos resultados de Skowronski e colaboradores (2011) em que foram verificadas respostas diferentes à vacinação consecutiva de crianças contra apenas uma das duas linhagens, sendo que B/Yam obteve resposta imune melhor do que B/Vic.

As razões para essa aparente diferença de susceptibilidade de idade entre as linhagens B/Vic e B/Yam descritas neste estudo ainda não puderam ser esclarecidas, sendo necessários mais estudos para determinar se cada linhagem tem maior impacto em determinados grupos etários.

Outra divergência entre as características clínico-epidemiológicos reportados na literatura e no presente estudo foi a diferença de gênero dos pacientes infectados por Flu B, sendo predominantemente em mulheres (61%). As amostras inseridas no estudo foram coletadas a partir dos bancos do LACEN-PR e do HC-UFPR que eram compostas de mulheres e homens na proporção de 54% e 46%, respectivamente. Nesta população as mulheres apresentaram mais casos de SRAG ($p=0.0043$ OR=1,470; IC95% 1,133 a 1,908). Além disso, a seleção de amostras de SG que foram incluídas no presente estudo foram pareadas por sexo e idade, buscando desta forma descartar a hipótese de que a correlação encontrada neste estudo seja decorrente de um viés de coleta de pessoas que procuram as unidades sentinelas.

Uma vez que a exposição e a infecção por vírus influenza não possuem risco de infecção relacionado ao gênero, ambos os gêneros devem ter as mesmas

chances de serem expostos e infectados. Estudos recentes sobre a epidemiologia de Flu B e a caracterização epidemiológica de suas linhagens corroboram com esse postulado. Independentemente da correlação entre linhagem vacinal e linhagem circulante, diferente do presente estudo, avaliações realizadas no Brasil, Austrália, China, Eslovênia, Índia e Inglaterra não relataram maior incidência de infecções por influenza ou de uma das linhagens de Flu B no gênero feminino (HORTHONGKHAM *et al.*, 2016; BARR, *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2016; SOCAN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015; AMBROSE & LEVIN, 2012).

7.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

Para a avaliação do perfil clínico das infecções por Flu B, prontuários e fichas de notificações de SG e SRAG dos pacientes incluídos neste estudo foram revisados. As fichas de notificações foram responsáveis por 80% da fonte de dados dos pacientes do estudo. Entretanto, apesar destas fichas serem elaboradas para prover as informações base para uma vigilância epidemiológica consistente, observou-se que elas não vêm atingindo alguns de seus propósitos estabelecidos pelo Ministério da Saúde: fornecer informação oportuna e de qualidade para o planejamento e adequação do tratamento; estabelecer medidas de prevenção e controle relacionadas à SG e à SRAG; determinar possíveis comportamentos inusitados por cada um dos vírus e identificar vírus com alta patogenicidade (SVS, 2015a; SVS 2015b), uma vez que mais de 50% das fichas avaliadas não continham informações essenciais como: fatores de risco, sintomas, utilização de oseltamivir e vacinação, sendo esta última ignorada em 99% das fichas de notificação e também em prontuários.

Devido à falta de informação no formulário de notificação de vigilância, não foi possível avaliar diferenças clínicas entre as linhagens de Flu B. Os resultados sugeriram que os pacientes B/Vic apresentaram com maior frequência febre e desconforto respiratório do que os pacientes B/Yam, mas como um total de 51% dos registros não continha esta informação, essa associação precisa ser avaliada com cautela.

O que se destaca na avaliação dos sintomas clínicos é que, apesar de ser critério obrigatório para classificação em síndrome gripal ou síndrome respiratória grave e para coleta de amostra respiratória para vigilância laboratorial, cerca de 10% dos pacientes com Flu B com informação sobre sinais e sintomas clínicos não relataram febre. Este dado levanta duas questões, a primeira é que ainda falta aos profissionais da saúde preparo tanto no preenchimento das fichas de notificação epidemiológicas, quanto na clareza de critérios para a classificação e manejo clínico de casos de SG e SRAG. A segunda questão é que, apesar de se ter que generalizar os sintomas mais comuns para criar um critério de vigilância global de influenza, essas infecções não possuem um perfil sintomático padrão, não há como estabelecer sinais ou sintomas com 100% de sensibilidade, o quadro clínico de influenza pode podendo se confundir com diversas etiologias de infecções respiratórias, levando a uma subestimativa do número total de casos. Uma vez que um sistema de saúde pública não tem como absorver e acompanhar todos casos de infecções de vírus respiratórios, ou pelo menos os grupos considerados de risco, é necessário que a imunização contra estes patógenos seja adequada e atinja seu objetivo de proteger esta população da evolução para doença grave.

Entre as condições que interferem no desenvolvimento de doença grave avaliada neste estudo podem ser citados presença de fatores de risco, tempo decorrido entre sintomas e atendimento hospitalar e uso de medicação.

Apesar de não ter disponível informações sobre esse critério em mais de 50% dos pacientes revisados. Não foi observada correlação entre fatores de risco e linhagem ou evolução para SRAG. Devido à faixa etária de prevalência de infecção ser de crianças e adultos jovens, não é de se esperar que a maior susceptibilidade dessa população à infecção por Flu B seja devido prioritariamente a condições de comorbidades, uma vez que a incidência de doenças de base são diretamente proporcionais à faixa etária. O Ministério da Saúde estima, a fim de planejamento de disponibilização de vacinas, uma taxa de 4% de brasileiros com algum tipo de comorbidade (SVS, 2016b) e estudos apontam que dentre esses a faixa etária mais vulnerável ao desenvolvimento de SRAG e evolução para óbito têm sido entre 40 e 60 anos (CARVALHANAS *et al.*, 2014).

Em ambas as linhagens, foi verificado o uso de oseltamivir já no momento de notificação de doença, o número de pacientes infectado por Flu B/Vic em uso

prévio de medicamento no momento da coleta da amostra foi o dobro dos infectados por B/Yam.

O tempo de procura de atendimento e consequentemente início de tratamento dentre os pacientes avaliados se mostrou tardio. A mediana total do intervalo entre início de sintomas e procura de atendimento médico foi de 3 dias, enquanto a recomendação de início do antiviral é nas primeiras 48hs após início dos sintomas clínicos. Quando comparado entre as linhagens, B/Vic apresentou o dobro (4) de mediana de dias de procura e uso de antiviral após início dos sintomas em relação à B/Yam (2). O início de tratamento após 4 dias de sintomas também é a mediana observada pelo MS nos casos de óbito por influenza entre os anos de 2013 e 2016 (SVS, 2016a).

No presente estudo a linhagem B/Vic apresentou resultados que sugerem maior virulência em relação à linhagem B/Yam, seja pelo acometimento em faixa etária mais jovem, distinção de gênero, infecções fora do período sazonal típico de influenza, sintomas e correlação com grande números de evolução para doença grave. Paddock e colaboradores (2012) observaram que a linhagem B/Vic foi responsável pela maioria dos óbitos atribuídos a Flu B no EUA entre 2000 e 2012. Horthongkham e colaboradores (2016) apesar de não ter encontrado diferenças na apresentação clínica entre linhagens, verificou que pacientes B/Vic apresentaram pior evolução em relação a duração da hospitalização e número de óbitos do que pacientes infectados por B/Yam. Como no presente estudo os dados clínicos sobre intensidade de sintomas, tempo de internamento e evolução dos pacientes estavam presentes em apenas 15% dos pacientes revisados, não foi possível incluir esses parâmetros de avaliação de perfil de infecção entre as linhagens e apesar dos resultados preliminares sugerirem uma associação de maior virulência da linhagem B/Vic na população infectada. Além disso, neste presente estudo, pode-se observar o ano em que houve a circulação de B/Vic ocorreu uma discordância com a linhagem vacinal, o que também pode ter contribuído para um maior número de casos graves. Mais estudos são necessários para esclarecer esta diferença de virulência observada entre as linhagens.

As linhagens de Flu B Victoria e Yamagata co-circularam ao decorrer das temporadas de influenza e se mostraram em padrões de frequência variáveis entre os anos e dentro do território do Paraná, desta forma, insistir em uma vacina composta por uma das duas linhagens incide em imunização parcial da população

mesmo quando há concordância entre a linhagem vacinal e a prevalente na temporada.

Esta discordância, conseqüentemente, incide em altos números de evolução para doença severa, que causa uma carga grande tanto em custo financeiro aos cofres públicos, quanto em custo humano, devido ao alto número de morbidade e mortalidade.

Foi observado também que Flu B tem infectado um perfil de população atípica da população acometida por infecções respiratórias. Composição vacinal e público alvo são critérios que tem implicações diretas nas estratégias e sucesso de programas de imunização. Entretanto o Brasil não tem comtemplado com eficiência nem um nem outro critério. São escassos os dados no País sobre perfil epidemiológico desta infecção e por falta de uma vigilância epidemiológica molecular funcional a linhagem de Flu B recomendada pela OMS para a composição da vacina sazonal contra influenza tem-se baseado na linhagem circulante na Austrália, que frequentemente é discordante com a linhagem circulante no Brasil.

E em vista que há indícios de que as linhagens tenham diferenças de impacto na população em virulência e evolução para doença grave o que pode estar relacionando com o rearranjo entre linhagens devido à co-circulação sazonal, o contínuo fornecimento de dados epidemiológicos que respondam sobre a caracterização molecular, prevalência e impacto de linhagens de Flu B na comunidade são cruciais para determinar medidas preventivas que buscam controlar esse grave problema de saúde pública.

8 CONCLUSÃO

Foram caracterizadas em B/Vic e B/Yam - com alta taxa de sensibilidade - as amostras de pacientes SG e SRAG por Flu B de todas as 22 regionais de saúde do estado do Paraná, sendo o número amostral representativo da população deste estado. Observou-se uma co-circulação das linhagens ao longo das 16 temporadas avaliadas com alternância de prevalência entre os anos e diferença na frequência das linhagens dentre as regiões do estado do Paraná.

Verificou-se discordância entre linhagem vacinal e linhagem prevalente na população nos anos de 2006 e 2013. Neste último ano foi possível avaliar a relação entre discordância vacinal e aumento de casos de doença grave, sendo a temporada com maior número de casos de SRAG por Flu B de todas avaliadas.

O perfil epidemiológico das infecções por Flu B demonstrou uma taxa de infecção com diferença entre gêneros – prevalência entre mulheres -, maior frequência de infecção em adolescentes e adultos jovens, independente da existência de fatores de risco. Os casos de gripe concentraram-se no inverno. O tratamento não foi prescrito nem para metade dos casos em que havia recomendação e teve em média início tardio – após 48hs de início de sintomas.

Infecções por B/Vic se relacionaram com prevalência em sexo feminino, mediana de idade de 23 anos, maior incidência de casos de SRAG. Enquanto infecções por B/Yam teve uma distribuição homogênea entre os gêneros, apresentou mediana de idade 10 anos mais velha que B/Vic e correlacionou-se com desenvolvimento de casos de SG.

9 PERSPECTIVAS

Avaliar a virulência das linhagens por meio do sequenciamento nucleotídico para identificação de *drifts* antigênicos e rearranjos genéticos e realizar testes fenotípicos de susceptibilidade em conjunto com análise de evolução clínica de pacientes internados por infecções respiratórias por Flu B, para assim entender as modificações no perfil populacional infectado pelo vírus Flu B e as diferenças sugeridas em estudos recentes entre a linhagem B/Vic e B/Yam.

10 CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA

- Abstract: 9TH WORLD CONGRESS OF THE WORLD SOCIETY FOR PEDIATRIC INFECTIOUS DESEASE. Rio de Janeiro, Brasil. Novembro, 2015.
- Abstract: OPTIONS IX FOR THE CONTROL OF INFLUENZA. Chicago, EUA. Agosto, 2016.
- Abstract: 2nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFLUENZA. Berlim, Alemanha. Setembro, 2016.
- Artigo (1^a autora): Molecular epidemiology of Flu B virus and implications in immunizations strategy, Southern Brazil - Vaccine 2018 Jan 2;36(1):107-113. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.033. Epub 2017 Nov 23.
- Artigo (colaboradora): Influenza Sentinel Surveillance and Severe Acute Respiratory Infection in a Reference Hospital, Southern Brazil - Rev Soc Bras Med Trop . 2019 Dec 20;53:e20170498. doi: 10.1590/0037-8682-0498-2017. eCollection 2019.

REFERÊNCIAS

ALLARD, R.; COUILLARD, M.; PILON, P.; KAFKA, M.; BÉDARD, L. Invasive bacterial infections following influenza: a time-series analysis in Montréal, Canada, 1996-2008. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 268-275, 2012.

ALONSO, W.J. *et al.* Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. **Am. J. Epidemiol.** v. 165, n. 12, p.1434-1442. 2007.

AMBROSE, C.S.; LEVIN M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. **HUM VACCIN IMMUNOTHER.** v. 8, n 1, p.81-8. Jan 2012.

ASKLING, H. H.; ROMBO, L. Influenza in travelers. **Curr Opin Infect Dis.** v. 23, n. 5, p.421-425. 2010.

BAGUELIN, M.; FLASCHE, S.; CAMACHO, A.; DEMIRIS, N.; MILLER, E.; EDMUNDS, W.J. Assessing optimal target populations for influenza vaccination programmes: an evidence synthesis and modelling study. **PLoS Med.** v. 10 n.10. 2013.

BARR, I.; VIJAYKRISHNA, D; SULLIVAN, S. Differential age susceptibility to influenza B/Victoria lineage viruses in the 2015 Australian influenza season. **Euro Surveill.** v. 21 n. 4. 2016.

BARROS, E.N.C.; CINTRA, O.; ROSSETO, E.; FREITAS, L.; COLINDRES, R. Patterns of influenza B circulation in Brazil and its relevance to seasonal vaccine composition. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 20 n. 1 p. 81-90. 2016.

BEDFORD, T.; SUCHARD, M.A.; LEMEY, P.; DUDAS, G.; GREGORY, V.; HAY, A. J.; MCCAULEY, J.W.; RUSSELL, C.A.; SMITH, D.J.; RAMBAUT, A. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. **eLife.** v. 3, p. 1914. 2014.

BELSHE, R.B.; COELINGH, K.; AMBROSE, C.S.; WOO, J.C.; WU, X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. **Vaccine.** v. 28, n.9, p. 2149-2156. 2010.

BIERE, B.; BAUER, B.; SCHWEIGER, B. Differentiation of influenza B virus lineages Yamagata and Victoria by real-time PCR. **J. Clin. Microb.** v. 48, n. 4, p. 1425-14-27. 2010.

BODEWES, R.; DE MUTSERT, G.; VAN DER KLIS, F.R.; VENTRESCA, M.; WILKS, S.; SMITH, D.J.; *et al.* Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. **Clin Vaccine Immunol.** V.18, p.469-76. 2011.

BRICKS, L.F.; DOMINGUES, C.M.I.; CARVALHANAS, T.R.M.P.; PEREIRA, S.F.; MORAES, J.C. Influenza em crianças o que há de novo? **Journal of Health and Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p.125-134, 2014.

BRIEDIS, D.J.; LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. **Virology**. p. 116:581–588. 1982

CAINI, S.; HUANG, S.Q.; CIBLAK, M.A.; KUSZNIERZ, G.; OWEN, R.; WANGCHUK, S.; *et al.* Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. **Influenza and Other Respiratory Viruses**. v. 9 p. 3–12. 2015.

CARMAN, B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. **Rev. Med. Virol.** v. 11, p. 347-349. 2001.

CARVALHANAS, T.R.M.P.; BRICKS, L.F.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, P.M.; PAIVA, T.M.; YU, A.L.F., *et al.* Analysis of 2,748 confirmed influenza cases in serious acute respiratory syndrome (SARS) hospitalizations in São Paulo State (SP), Brazil – 2013. In: 34 ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES, 32. 2014. Disponível em: <http://espid.meetingxpert.net/ESPID_945/poster_94756/program.aspx>.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Flu Vaccination Coverage, United States, 2015-16 Influenza Season**. Seasonal influenza. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/fluview/covage-1516estimates.htm>>.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Influenza symptoms and laboratory diagnostics procedures**, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>>.

CHEN, J.M.; GUO, Y.J.; WU, K.Y.; GUO, J.F.; WANG, M.; DONG, J.; *et al.* Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus. **Arch Virol.** v. 152, p.152. 2007.

CHEN, R.; HOLMES, E.C. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. **J Mol Evol.** v. 66, p.655-663 2008.

CHO, C.H.; LEE, C.K.; NAM, M.H.; YOON, S.Y.; LIM, C.S.; CHO, Y.; KIM, Y.K. Evaluation of the AdvanSure™ real-time rt-PCR compared with culture and SeeplexRV15 for simultaneous detection of respiratory viruses, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** Seoul, 2014.

CHOA, C.H.; CHULTENB, B.; LEEA, C.K.; NAMA, M.H.; YOONA, S.; LIMA, C.S.; CHOA, Y.; KIMA, Y.K. Evaluation of a novel real-time rt-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viroses. **J. Clin.Virol.** V. 57, p. 338–342. 2013.

COLMAN, P.M.; VARGHESE, J.N.; LAVER, W.G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. **Nature.** v.303, p. 41-44. 1983.

COMPANS, R.W.; MEIER-EWERT, H.; PALESE, P. Assembly of lipid-containing viroses. **J. Supramol. Struct.** v. 2, n. 2-4, p. 496-511. 1974.
Comparative Epidemiology of Influenza B Yamagata- and Victoria-Lineage Viruses in Households. **Am J Epidemiol.** v. 182 n. 8 p.705-13. 2015.

COX, N.J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet.** v. 354 p. 1277-1282. 1999.
DENG, Yi-Mo; IANELLO, P.; CALDWELL, N.; JELLEY, L.; KOMADINA, N.; BAAS, C.; KELSO, A.; BARR, I. G. The use of pyrosequencer-generated sequence-signatures to identify the influenza B-lineage and the subclade of the B/Yamataga-lineage viruses from currently circulating human influenza B viruses. **J. Clin. Virol.** v. 28, p. 94-99. 2013.

DOMINGUES, C.M.A.S.; OLIVEIRA, W.K. Uptake of pandemic influenza (H1N1)-2009 vaccines in Brazil 2010. **Vaccine.** v.30, n.32, p.4744-4751. 2012.
ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Overview of vaccination recommendations and coverage rates in the EU Member States for the 2012–13 influenza season. **Technical Report - Seasonal influenza vaccination in Europe.** 2014. Disponível em <
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Seasonal-influenza-vaccination-Europe-2012-13.pdf>>.

FALLEIROS A., L.H.; BRICKS, L.F. Influenza B Burden in Latin America and Potential Benefits of the New Quadrivalent Vaccines. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.** v.5, n.1. 2016.

FAUQUET, C.M., *et al.* **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. p. 1259. London: Elsevier Academic Press, 2004.

IORE, A.E.; BRIDGES, C.B.; KATZ, J.M.; COX, N.J. Inactivated influenza vaccines. In: PLOTKIN, S.; ORENSTEIN, W.; OFFIT, P. **Vaccines**. p. 257-93. 2013.

IORE, A.E.; FRY, A.; SHAY, D.; GUBAREVA, L.; BRESEE, J.S.; UYEKI, T.M. Antiviral agents for the treatment and hemoprophylaxis of influenza — recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**. v. 60, p. 1–24. 2011.

FORLEO-NETO, E.; *et al.* Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 2, p. 267-274. 2003.

FREITAS, A.R.; FRANCISCO, P.M.; DONALISIO, M.R. Mortality associated with influenza in tropics, state of São Paulo, Brazil, from 2002 to 2011: the pre-pandemic, pandemic, and post-pandemic periods. **Influenza Research and Treatment**. 2013.

GLEZEN, W.P.; SCHMIER, J.K.; KUEHN, C.M.; RYAN, K.J. The burden of influenza B: a structure literature review. **American Journal of Public Health**. v. 103 n. 3. p. 43-51. 2013.

GUBAREVA, L.V.; WEBSTER, R.G.; HAYDEN, F.G. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 45, p. 3403–3408. 2001.

HAGMAIER, K. *et al.* Novel gene product of Thogoto virus segment 6 codes for an interferon antagonist. **J. Virol**. v. 77, n.4, p. 2747-2752. 2003.

HAYDEN, F.G.; PALESE, P. Influenza virus. **Clinical Virology**. p. 911-942. 2002.

HEIKKINEN, T.; IKONEN, N.; ZIEGLER, T. Impact of in fluenza B lineage level mismatch between trivalent seasonal in fluenza vaccines and circulating viruses, 1999 - 2012. **Clin Infect Dis**. v. 59 p.1519 –24. 2014.

HERRMANN, B.; LARSSON, C.; ZWEYGBERG, B. W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B nested reverse RT-PCR: comparision to virus

isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). **J. Clin. Microb.** v. 39, p. 134-138, 2001.

HILLEMAN, M.R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**. V. 19 n. 20, p. 3068-3087. 2002

HIRST, G. H. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. **Science**, v. 94, n. 2427, p. 22-23. 1941.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 14, p. 129-149. 2001.

HORTHONGKHAM, N.; ATHIPANYASILP, N.; PATTAMA, A.; KAEWNAPAN, B.; SORNPRASERT, S.; SRISURAPANONT, S.; *et al.* Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014. **PLoS ONE**. v. 11 n. 7. 2016.

IMAI, M.; WATANABE, S.; NINOMIYA, A.; OBUCHI, M.; ODAGIRI, T. Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. **J. Virol.** v. 78, n.20, p. 11007-11015. 2004.

JACKSON, D.; ELDERFIELD, R. A.; BARCLAY, W. S. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. **J Gen Virol**. v. 92, p. 1-17. 2011.

KIBENGE, F. S. *et al.* Antigenic variation among isolates of infectious salmon anemia virus correlated with generic variation of the viral haemmagglutinin gene. **J. Gen. Virol.** v. 82, n. 12, p. 2869-2879. 2001.

KILBOURNE, E. D. *et al.*, Protection of mice with recombination influenza virus neuraminidase. **J. Infect. Dis.** v. 189, n. 3, p. 459-461. 2004

LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clin. Microbiol.** v. 20, n. 1, p.49. 2007.

LINDSTROM, S.E.; HIROMOTO, Y.; NISHIMURA, H.; SAITO, T.; NEROME, R.; NEROME, K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages

and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. **J Virol**; v. 73, p.4413-4426. 1999.

LO, Y.C.; CHUANG, J. H.; KUO, H. W.; *et al.* Surveillance and vaccine effectiveness of an influenza epidemic predominated by vaccine-mismatched influenza B/Yamagata-lineage viruses in Taiwan, 2011-12 season. **PLOS ONE**. v. 8 n. 3. 2013.

MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 10, p. 190-212. 2004.

MATROSOVICH, M.N. *et al.* Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. **J. Virol.** v. 78, n. 22, p. 12665-12667. 2004.

MCCULLERS, J.A.; SAITO, T.; IVERSON, A.R. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. **J Virol.** v. 78, n 23, p. 12817–1281728. 2004.

MICHIELS, B.; GOVAERTS, F.; REMMEN, R.; VERMEIRE, E.; COENEN, S.A systematic review of the evidence on the effectiveness and risks of inactivated influenza vaccines in different target groups. **Vaccine**. v.29, n.49, p.9159-9170. 2011.

MOURA, F.E.A.; *et al.* Hospital study of acute respiratory infections in children of Northeast Brazil. **J. Bras. Pat. Med. Lab.** v. 39, p. 275-282. 2003.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Protocolo de tratamento de Influenza : 2015**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2015. Disponível em <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Protocolo_de_Tratamento_de_Influenza_2015.pdf >.

MUNOZ, F.M. Influenza virus infection in infancy and early childhood. **Pediatr. Respir. Rev.** v. 4, p. 99-104. 2003.

MURPHY, B. R. WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. **Fields virology**. ed. 4, p. 1533-1579. 2001.

NEIRYNCK, S.; DEROO, T.; SAELENS, X.; van LANDSCHOOT, P.; JOU, W.M.; FIERIS, W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. **Nat Med**. v. 5, p. 1157–1163. 1999.

NETO, E.F. *et al.* Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 2, p. 267-274. 2003.

NEUZIL, K.M.; HOHLBEIN, C.; ZHU, Y. Illness among schoolchildren during influenza season: effect on school absenteeism, parental absenteeism from work, and secondary illness in families. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.** v. 156, p. 986-991. 2002.

NICHOLSON, K.G. Clinical features of influenza. **Semin Respir Infect.** v. 7, p. 26–37. 2010.

NOAH, D.L.; KRUG, R.M. Influenza virus virulence and its molecular determinants. **Adv Virus Res.** v. 65, p. 121–145. 2005.

NOAH, D.L.; NOAH, J.W. Adapting global influenza management strategies to address emerging viruses. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 305, p. 108 – 117. 2013.

NODA, T. *et al.* Architecture of ribonucleo-protein complexes in influenza A virus particles. **Nature**. v. 439, n. 7075, p. 490-492. 2006.

OLIVEIRA, M.; MOTTA, F.; SOARES, S.; RESENDE, P.; CARNEY, S.; COSTA, J. Mismatch between vaccine strains and circulating influenza B viruses in different regions of Brazil: 2001–2013. **Options for the control of influenza**. p. 382. 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Influenza Fact Sheet N.211**. Genebra, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>>.

OONG, X.Y.; NG, K.T.; LAM, T.T.; PANG, Y.K.; CHAN, K.G.; HANAFI, N.S.; *et al.* Epidemiological and evolutionary dynamics of influenza B viruses in Malaysia, 2012–2014. **PLoSOne**. v. 10 n.8. 2015.

OPS, Organização Pan Americana de Saúde. **Health Establishments Preparation for Unusual or Unexpected Cases or Clusters of Severe Acute Respiratory Infection (SARI)**. 2009. Disponível em:

<http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=1265&Itemid=569>.

OPS, Organização Pan Americana de Saúde. **Influenza and Other Respiratory Viruses under Surveillance, 2010-2015**. 2015. Disponível em: <http://ais.paho.org/hip/viz/ed_flu.asp>.

OSTERHOLM, M. T.; KELLEY, N. S.; SOMMER, A.; BELONGIA, E. A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 12, n. 1, p.36-44. 2012.

ÖZDEMİR, M.; YAVRU, S.; BAYSAL, B. Comparison of the detection of Influenza A and B viruses by different methods. **Journal of International Medical Research**. v. 40, p. 2401. 2012.

PADDOCK, C.D.; LIU, L.; DENISON, A.M.; BARTLETT, J.H.; HOLMAN, R.C.; DELEON-CARNES, M.; EMERY, S.L.; DREW, C.P.; SHIEH, W.J.; UYEKI, T.M.; ZAKI, S.R. Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal influenza B virus infection. **The Journal of Infectious Disease**. v. 205, n. 6, p. 895-905, 2012.

PAIVA, T.M.; BENEGA, M.A.; SILVA, D.B.; *et al*. Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in Sao Paulo, Brazil, 1996–2012: implications for vaccine composition strategy. **J Med Virol**. v. 85 n.11 p.1983–1989. 2013.

PALESE, P.; SHAW, M. L. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. **Fields Virology**. 5 ed., p. 1647-1689. 2006.

PEROSA, A.; BELLEI, N. Influenza B circulation during twelve influenza seasons (2001–2013) in a tertiary hospital in São Paulo, Brazil. **Options for the control of influenza**. p. 637. 2013.

PLANS-RUBIÓ, P. The vaccination coverage required to establish herd immunity against influenza viruses. **Preventive Medicine**. v. 55, n. 1, p. 72-77. 2012.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2013 to 2014**. 2014. Disponível em: <https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2013_2014.pdf>.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2014 to 2015**. 2015. Disponível em: <https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2014_2015.pdf>.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2015 to 2016**. 2016. Disponível em: <https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2015_2016.pdf>.

RACANIELLO, V.R.; PALESE, P. Influenza B virus genome: assignment of viral polypeptides to RNA segments. **J. Virol.** v. 29, n. 1, p. 361-373. 1979.

REED, C.; MELTZER, M.I.; FINELLI, L.; FIORE, A. Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine. **Vaccine.** v.30 p.1993-1998. 2012.

ROTA, P.A.; WALLIS, T.R.; HARMON, M.W; ROTA, J.S; KENDAL, A.P; NEROME, K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. **Virology.** v. 175, p.59-68. 1990.

SCHOTSAERT, M.; YSENBAERT, T.; NEYT, K.; IBANEZ, L. I.; BOGAERT, P.; SCHEPENS, B.; LAMBRECHT, B. N.; FIERIS, W.; SAELENS, X.; Natural and long-lasting cellular immune responses against Influenza in the M2e-immune host. **Mucosal Immunol.** v. 6, p. 276–287. 2013.

SESA-PR, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Informe epidemiológico CIEVS- PARANÁ SE 49.** 2013. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/ACS/Informe49.pdf>>.

SESA-PR, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Protocolo de tratamento de influenza.** 2014. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/02014CIEVS/PROTOCLO_SESA_PARANA.pdf>.

SHAW, M.W.; CHOPPIN, P.W.; LAMB, R.A. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 80, n16, p. 4879-4883. 1983.

SIMEPAR. Sistema meteorológico do Paraná. **Histórico de condições climáticas dentre os anos 2013 a 2016.** 2016. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Protocolo_de_Tratamento_de_Influenza_2015.pdf>.

SKOWRONSKI, D.M.; HOTTES, T.S.; SERRES, G.; WARS, B.J.; JANJUA, N.Z.; SABAIDUC, S.; CHAN, T.; PETRIC, M. Influenza B/Victoria antigen induces strong recall of B/Yamagata but lower B/Victoria response in children primed with two doses of B/Yamagata. **Pediatr Infect Dis J.** v. 30 n. 10 p:833-839. 2011.

SMITH, W; ANDREWES, C.H.; LAIDLAW, P.P. A virus obtained from influenza patients. **Lancet**, v.2, p. 66-68, 1933.

SOCAN, M.; PROSENC, K.; UCAKAR, V.; NATASA, B. A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. **J. Clin. Virol.** v. 61, p.156-160. 2014.

STRALIOTTO, S. M. *et al.* Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 35, p. 283-291. 2002.

STRÁNSKÁ, R.; SCHUURMAN, R.; VOS, M.; LOON, A.M.V. Routine use of a highly automated and internally controlled real-time PCR assay for the diagnosis of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. **Journal of Clinical Virology.** v.30, p. 39–44. 2004.

STRAY, S. J.; PITTMAN, L. B.. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. **Virology Journal.** v. 9, p. 91. 2012.

STUART-HARRIS, C.H.; SCmLD, G.C; OXFORD, J.S. **Influenza: The Viruses and the Disease.** 2nd. 1985.

SUZUKI, T. *et al.* Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. **J. Virol.** v. 79, n. 18, p. 11705-11715. 2005.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2013. **Informe epidemiológico.** 2014. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2014. **Informe epidemiológico.** 2015c. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2015. **Informe epidemiológico.** 2016a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza.pdf)>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2016. **Informe epidemiológico.** 2016b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza.pdf)>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. **Informe técnico: campanha nacional de vacinação contra a Influenza. Brasília, 2016.** Brasília, 2016c. Disponível em: <http://www.sbim.org.br/wp-content/uploads/2015/04/Informe_Campanha_Influenza-_25_03_2015.pdf>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. **Informe técnico: campanha nacional de vacinação contra a Influenza. Brasília, 2017.** Brasília, 2017. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/sipni/03%2003%202017%20Informe_Cp_Influenza%20_%20final.pdf>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. **Vigilância Sentinela de Síndrome Gripal (SG) no Brasil.** Brasília, 2015a. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Vigilancia_Sentinela_de_SG_no_Brasil_FINAL.pdf>.

SVS, Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde. **Vigilância Sentinela de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) em Unidade de Terapia intensiva.** Brasília, 2015b. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Vigilancia_Sentinela_de_SRAG_no_Brasil_FINAL.pdf>.

TAKASHITA, E.; *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. **Antiviral Research.** v. 117, p. 27-30.

TALAVERA, G. A. Influenza: historia de una enfermedad. **Rev. Bioméd.**, v. 10, n. 1 p.57-61,1999.

TEWAWONG, N.; SUWANNAKARN, K.; PRACHAYANGPRECHA, S; KORKONG, S.; VICHIWATTANA, P.; VONGPUNSAWAD, S. Molecular epidemiology and

phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014. **PLoSOne**. v. 10 n. 1. 2015.

THOMPSON, W.W.; SHAY, D.K.; WEINTRAUB, E.; BRAMMER, L.; BRIDGES, C.B.; COX, N.J.; *et al.* Influenza-associated hospitalizations in the United States. **JAMA** 2004.

THOMPSON, W.W.; SHAY, D.K.; WEINTRAUB, E.; BRAMMER, L.; BRIDGES, C.B.; COX, N.J.; *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the united states. **Jama**. 2003.

TREANOR, J.J. HAYDEN, F.G.; VROOMAN, P.S.; BARBARASH, R.; BETTIS, R.; RIFF, D.; SINGH, S.; KINNERSLEY, N.; WARD, P.; MILLS, R.G. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute Influenza: a randomized controlled trial. **JAMA**. v. 283, n. 8, p. 1016-1024. 2000.

van REGENMORTEL, M.H.V. *et al.* Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. **Seventh Report of the Internacional Comitee on Taxonomy of Viruses**. p. 525-559. 2000.

VIDAI, L.R.; SIQUEIRA, M.M.; NOGUEIRA, M.B.; *et al.* The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 103 n. 2 p.180–5. 2008.

VIJAYKRISHNA, D.; HOLMES, E.C.; JOSEPH, U.; FOURMENT, M.; SU, Y.C.F.; HALPIN, R. *et al.* **The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses**. eLife. 2015.

WANG, C.S.; WANG, S.T.; LAI, C.T.; LIN, L.J.; LEE, C.T.; CHOU, P. Reducing major cause-specific hospitalization rates and shortening hospital stays after influenza vaccination. **Clinical Infectious Disease**. v.39, n.11, p.1604-1610. 2004.

WEBSTER, R. G. Estimation of the molecular weights oh the polypeptide chains from the isolated hemagglutinin and neuroaminidase subunits of influenza viruses. **Virology**. v. 40, p. 643. 1970.

WEBSTER, R.G.; WRIGHT, S.M.; CASTRUCCI, M.R.; Bean, W.J.; KAWAOKA, Y. Influenza - a model of an emerging virus disease. **Intervirolgy**, v. 35, p. 16 – 25. 1993.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses**. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_>.

WHO, World Health Organization. Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. **Weekly Epidemiological Record**. v. 87, n. 47, p. 461-476. Genebra, 2012.

WHO. World Health Organization. **Influenza (Seasonal)**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>>.

WHO. World Health Organization. Memorandum. A revised system of nomenclature for influenza viruses. **Bull. World Health Organ**. v. 58, p. 585-591. 1980.

WHO. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016 southern hemisphere influenza season. 2015. **Influenza (Seasonal)**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201509_recommendation.pdf?ua=1>.

WILEY, D. C.; WILSON, I. A.; SHEKEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**. v. 289, n. 5796, p. 373-378. 1981.


WONG, C. K. S.; TSANG, G. C. H.; CHAN, K. H.; LI, O. T. W.; PEIRIS, M.; POON, L. L. M. A novel molecular test for influenza B virus detection and lineage differentiation. **J. Med. Vir**. v. 86, p. 2171-2176. 2014.

WRIGHT, P.; NEUMAN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. **Fields Virology**. ed. 5, p. 1692-1740. 2006.

XU, C.; CHAN, K.H.; TSANG, T.K.; FANG, V.J.; FUNG, R.O.; IP, D. K.; *et al.* ZAMAN, K.; ROY, E.; ARIFEEN, S.E.; RAHMAN, M.; RAQIB, R.; WILSON, E.; OMER, S.B.; SHAHID, N.S.; BREIMAN, R.F.; STEINHOFF, M.C. Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 15, p. 1555-1564. 2008.

ANEXOS


ANEXO 1. FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL DOS CASOS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE INTENSIVA DE TRATAMENTO.

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE		Nº _____ SIVEP Gripe SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA GRIPE	
FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL - CASOS DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE INTERNADOS EM UTI			
CASO DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG): Indivíduo hospitalizado com febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e que apresente dispneia ¹ .			
		1 Data do preenchimento: ____/____/____	
2 UF: ____	3 Município: _____	Código (IBGE): ____/____/____	
4 Unidade Sentinela: _____		Código (CNES): ____/____/____	
Dados do Paciente	5 Nome: _____		6 Sexo: 1-Masculino 2-Feminino ____ 9-Ignorado
	7 Data de nascimento: ____/____/____	8 (ou) Idade: ____/____/____ 1-Dia 2-Mês 3-Ano ____	9 Gestante: ____ 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4-Mãe Gestacional ignorada 5-Não 6-Não se aplica 9-Ignorado
	10 Raça/COR: 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9-Ignorado ____		
	11 Se indígena, qual etnia? _____		
	12 Escolaridade: ____ 0-Sem escolaridade/Analfabeto 1-Fundamental 1º ciclo (1ª a 5ª série) 2-Fundamental 2º ciclo (6ª a 9ª série) 3-Médio (1ª ao 3ª ano) 4-Superior 5-Não se aplica 9-Ignorado		
13 Nome da mãe: _____			
Dados de Residência	14 CEP: ____-____		
	15 UF: ____	16 Município: _____	Código (IBGE): ____/____/____
	17 Bairro: _____	18 Logradouro (Rua, Avenida, etc.): _____	19 Nº ____
	20 Complemento (apto, casa, etc): _____		21 (DDD) Telefone: ____-____/____/____
	22 Zona: ____ 1-Urbana 2-Rural 3-Periurbana 9-Ignorado	23 País: (se residente fora do Brasil) _____	
Dados Clínicos e Epidemiológicos	24 Data dos 1ºs Sintomas: ____/____/____	25 Sinais e Sintomas: 1-Sim 2-Não 9-Ignorado ____/____ Febre ____/____ Tosse ____/____ Dor de Garganta ____/____ Dispneia ____/____ Outros _____	
	26 Fatores de risco: 1-Sim 2-Não 9-Ignorado ____/____ Puérpera (até 42 dias do parto) ____/____ Doença Cardiovascular Crônica ____/____ Pneumopatia Crônica ____/____ Síndrome de Down ____/____ Doença Hepática Crônica ____/____ Obesidade, IMC ____/____ ____/____ Diabetes mellitus ____/____ Doença Neurológica Crônica ____/____ Outros ____/____ Imunodeficiência/Imunodepressão ____/____ Doença Renal Crônica		
	27 Recebeu vacina contra Gripe? (últimos 12 meses) ____ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado		
	28 Nº de doses ____ 1-1 dose 2-2 doses ____	29 Data da última dose ____/____/____	

Dados de Atendimento	30	Uso de antiviral: <input type="checkbox"/> 1-Não 2-Oseltamivir 3-Zanamivir 9-Ignorado 4-Outro, especifique: _____	31	Data início do tratamento _____	32	Data da Hospitalização _____		
	33	Foi internado em UTI? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	34	Data da entrada na UTI _____	35	Data da saída da UTI _____		
	36	Fez uso de suporte ventilatório? (máscara, cateter, etc.) <input type="checkbox"/> 1-Sim, invasivo 2-Sim, não invasivo 3-Não 9-Ignorado	37	Raio X de Tórax <input type="checkbox"/> 1-Normal 2-Infiltrado intersticial 3-Consolidação 4-Misto 5-Outro: _____ 6-Não realizado 9-Ignorado	38	Data do Raio X _____		
	39	Coletou amostra? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	40	Data da coleta _____	41	Tipo de amostra <input type="checkbox"/> 1-Secreção de Nasofaringe 2-Lavado Brônco-alveolar 3-Tecido post-mortem 4-Outra, qual? _____ 9-Ignorado		
Dados Laboratoriais	42					Nº Requisição do GAL: _____		
	IFI							
	43	Resultado <input type="checkbox"/> 1-Positivo 2-Negativo 3-Inconclusivo 4-Não realizado 9-Ignorado	44	Data do resultado _____				
	45					Agente Etiológico		
	Influenza: <input type="checkbox"/> 1-Influenza A 2-Influenza B Outros vírus respiratórios: (marcar X) <input type="checkbox"/> VRS <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____							
Dados Laboratoriais	46					Laboratório: _____ Código (CNES): _____		
	RT-PCR							
	47	Resultado <input type="checkbox"/> 1-Detectável 2-Não Detectável 3-Inconclusivo 4-Não realizado 9-Ignorado	48	Data do resultado _____				
	49					Agente Etiológico		
	Influenza: <input type="checkbox"/> 1-Influenza A 2-Influenza B Se Influenza A, subtipo: <input type="checkbox"/> 1-Influenza A(H1N1)pdm09 2-Influenza A/H1 Sazonal 3-Influenza A/H3 Sazonal 4-Influenza A não subtipado 5-Outro, especifique: _____ Outros vírus respiratórios: (marcar X) <input type="checkbox"/> VRS <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 4 <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> Metapneumovírus <input type="checkbox"/> Bocavírus <input type="checkbox"/> Rinovírus <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____							
Conclusão	50					Laboratório: _____ Código (CNES): _____		
	51					Classificação final do caso <input type="checkbox"/> Tipo: Subtipo, se Influenza A. 1-SRAG por Influenza <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (marcar conforme categoria do campo agente etiológico) 2-SRAG por outro vírus respiratório 3-SRAG por outro agente etiológico, qual _____ 4-SRAG não especificado		
	52					Critério de Encerramento <input type="checkbox"/> 1-Laboratorial 2-Clinico-Epidemiológico 3-Clinico		
53		Evolução do Caso <input type="checkbox"/> 1-Cura 2-Óbito 9-Ignorado	54		Data da alta ou óbito _____	55	Data do Encerramento _____	
56							OBSERVAÇÕES	
57					Profissional de Saúde Responsável: _____	58		Registro Conselho/Matrícula: _____

¹ Também podem ser observados os seguintes sinais: saturação de O₂ menor que 95% ou desconforto respiratório ou aumento da frequência respiratória.

ANEXO 2. FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL DOS CASOS DE SÍNDROME GRIPAL QUE REALIZARAM A COLETA DE AMOSTRA.


 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE		Nº _____
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA GRIPE		SIVEP Gripe
FICHA DE REGISTRO INDIVIDUAL - CASOS DE SÍNDROME GRIPAL QUE REALIZARAM COLETA DE AMOSTRA		
CASO DE SÍNDROME GRIPAL (SG): Indivíduo com febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e com início dos sintomas nos últimos 7 dias.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 1 Data do preenchimento: _____ </div> </div>		
2 UF: _____	3 Município: _____	Código (IBGE): _____
4 Unidade Sentinela: _____		Código (CNES): _____
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 5 Nome: _____ </div> <div> 6 Sexo: 1-Masculino 2-Feminino 9-Ignorado </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 7 Data de nascimento: _____ </div> <div> 8 (ou) Idade: _____ <small>1-Dia 2-Mês 3-Ano</small> </div> <div> 9 Gestante: _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 10 Raça/Cor: 1-Branca 2-Negra 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9-Ignorado </div> <div> 11 Se indígena, qual etnia? _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 12 Escolaridade: <small>0-Sem escolaridade/Analfabeto 1-Fundamental 1ª ciclo (1ª a 5ª série) 2-Fundamental 2ª ciclo (6ª a 9ª série) 3-Médio (1ª ao 3ª ano) 4-Superior 5-Não se aplica 9-Ignorado</small> </div> <div> 13 Nome da mãe: _____ </div> </div>		
14 CEP: _____		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 15 UF: _____ </div> <div> 16 Município: _____ </div> <div> 17 Código (IBGE): _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 18 Bairro: _____ </div> <div> 19 Logradouro (Rua, Avenida, etc.): _____ </div> <div> 20 Nº: _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 21 Complemento (apto, casa, etc.): _____ </div> <div> 22 (DDD) Telefone: _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 23 Zona: _____ <small>1-Urbana 2-Rural 3-Periurbana 9-Ignorado</small> </div> <div> 24 País: (se residente fora do Brasil) _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 25 Data dos 1ºs Sintomas: _____ </div> <div> 26 Sinais e Sintomas: 1-Sim 2-Não 9-Ignorado <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 27 Febre _____ </div> <div> 28 Tosse _____ </div> <div> 29 Dor de Garganta _____ </div> </div> <div> 30 Outros: _____ </div> </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 31 Fatores de risco: 1-Sim 2-Não 9-Ignorado <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 32 Puérpera (até 42 dias do parto) _____ </div> <div> 33 Doença Cardiovascular Crônica _____ </div> <div> 34 Pneumopatia Crônica _____ </div> </div> <div> 35 Síndrome de Down _____ </div> <div> 36 Doença Hepática Crônica _____ </div> <div> 37 Obesidade, IMC _____ </div> </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 38 Diabetes mellitus _____ </div> <div> 39 Doença Neurológica Crônica _____ </div> <div> 40 Outros _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 41 Imunodeficiência/Imunodepressão _____ </div> <div> 42 Doença Renal Crônica _____ </div> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 43 Recebeu vacina contra Gripe? (últimos 12 meses) <small>1-Sim 2-Não 9-Ignorado</small> </div> <div> 44 Nº de doses _____ </div> <div> 45 Data da última dose _____ </div> </div>		

Atendimento	30	Uso de antiviral: <input type="checkbox"/> 1-Não 2-Osetamivir 3-Zanamivir 4-Outro, especifique: _____ 9-Ignorado	31	Data do início do tratamento ____/____/____
	32	Data da coleta: ____/____/____	33	Tipo de amostra: <input type="checkbox"/> 1-Secreção de Nasofaringe 2-Lavado Bronco-alveolar 3-Tecido post-mortem 4-Outra, qual? _____ 9-Ignorado
Dados Laboratoriais	34 Nº Requisição do GAL: _____			
	IFI			
	35	Resultado <input type="checkbox"/> 1-Positivo 2-Negativo 3-Inconclusivo 4-Não realizado 9-Ignorado	36	Data do resultado ____/____/____
	37 Agente Etiológico			
	Influenza: <input type="checkbox"/> 1- Influenza A 2- Influenza B Outros vírus respiratórios: (marcar X) <input type="checkbox"/> VRS <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____			
38 Laboratório: _____		Código (CNES): ____/____/____/____/____		
Dados Laboratoriais	RT-PCR			
	39	Resultado <input type="checkbox"/> 1-Detectável 2-Não Detectável 3-Inconclusivo 4-Não realizado 9-Ignorado	40	Data do resultado ____/____/____
	41 Agente Etiológico			
	Influenza: <input type="checkbox"/> 1- Influenza A 2- Influenza B Se Influenza A, subtipo: <input type="checkbox"/> 1-Influenza A(H1N1)pdm09 2-Influenza A/H1 Sazonal 3-Influenza A/H3 Sazonal 4-Influenza A não subtipado 5-Outro, especifique: _____ Outros vírus respiratórios: (marcar X) <input type="checkbox"/> VRS <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> Parainfluenza 4 <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> Metapneumovirus <input type="checkbox"/> Bocavirus <input type="checkbox"/> Rinovirus <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____			
	42 Laboratório: _____		Código (CNES): ____/____/____/____/____	
Conclusão	43	Classificação final do caso <input type="checkbox"/> Tipo Subtipo, se influenza A. 1-SG por influenza <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (marcar conforme categorias do campo agente etiológico) 2-SG por outro vírus respiratório 3-SG por outro agente etiológico, especifique: _____ 4-SG não especificado	44	Data do Encerramento ____/____/____
	45 Observações: _____			
46 Profissional de Saúde Responsável: _____			47 Registro Conselho/Matrícula: ____/____/____/____/____	

ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO

ARTICLE IN PRESS

Vaccine xxx (2017) xxx–xxx




ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://ScienceDirect.com)

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Molecular epidemiology of influenza B virus and implications in immunization strategy, Southern Brazil

Bruna Lapinski^b, Luciane A. Pereira^b, Meri B. Nogueira^b, Luine R. Vidal^b, Irina Riediger^c, Maria C. Debur^c, Mayra Presibella^c, Sonia M. Raboni^{a,b,*}

^a Infectious Diseases Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Brazil
^b Virology Laboratory, Universidade Federal do Paraná, Brazil
^c Health Public Laboratory (LACEN-PR), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 April 2017
Received in revised form 11 October 2017
Accepted 13 November 2017
Available online xxxxx

Keywords:
Influenza B lineages
Influenza vaccine
Respiratory infection surveillance

ABSTRACT

Epidemiological indicators have shown the substantial impact of influenza B (Flu B) on the development of severe acute respiratory infection (SARI) and on mortality rates. In Brazil, the trivalent vaccine, composed of only one Flu B lineage is available. We investigated Flu B infections in clinical samples collected by the epidemiological surveillance service of Paraná State, Brazil, from 2013 to 2016. The Flu B lineages Yamagata- (B/Yam) and Victoria-like (B/Vic) were identified using the qRT-PCR assay, and notification forms were reviewed. Among 379 Flu B positive samples evaluated, 370 (98%) were characterized as B/Yam or B/Vic lineages. Both co-circulated with a frequency of 47% and 53%, respectively. B/Yam infected equally both genders, while B/Vic was more frequent in females (71%). The median age of patients infected by B/Vic (23y; 11–35) was lower than that of patients infected by B/Yam (32y; 12–50). Mismatch between the vaccine and the circulating strain was observed in the 2013 season, with a high number of SARI cases. B/Vic lineage was associated with a larger number of SARI cases (62%), while B/Yam with influenza-like illness (ILI) (61%). Differences were observed in the strains circulating in separate regions of Paraná State. B/Vic was prevalent in the northwestern (67%) and B/Yam in the south-eastern region (60%). The unpredictability of Flu B lineage circulation causes a substantial increase in severe disease during epidemics in a vaccine mismatch season. In addition, the differences in the epidemiological profile of the target population of Flu B infections in relation to other respiratory viruses, as well as among the B/Vic and B/Yam lineages may also be associated to an increase in disease burden. These findings have direct consequences on vaccination strategies. Therefore, further molecular epidemiology studies of Flu B in Brazil are required to corroborate these primary results.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Molecular epidemiology of influenza B virus and implications in immunization strategy, Southern Brazil

Bruna Lapinski², Luciane A Pereira², Meri B Nogueira², Luine R. Vidal², Irina Riediger³, Maria C. Debur³, Mayra Presibella³, Sonia M Raboni^{1,2}.

¹Infectious Diseases Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil (HC-UFPR).

²Virology Laboratory, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

³Health Public Laboratory, Brazil (LACEN-PR).

#Corresponding author:

Infectious Disease Division - Universidade Federal do Paraná

Rua General Carneiro, 180 – 3º andar

Zip code: 82060-900

Curitiba – PR, Brazil

Fax number: +55 41 33601811

Telephone number: +55 41 33607974

E-mail: sraboni@ufpr.br

Funding: Sanofi Pasteur

ABSTRACT

Epidemiological indicators have shown the substantial impact of influenza B (Flu B), both on the number of children deaths, and on the development of severe acute respiratory infection (SARI) on young adults. In Brazil, the vaccine provided within the National Immunization Program is the trivalent vaccine, consisting of only one of the two Flu B lineages. The present study investigated influenza B infections in clinical samples collected by the epidemiological surveillance and delivered to the Paraná Health Public Laboratory (Lacen-PR), Brazil, from 2013 to 2016. Flu B lineages: Yamagata-like (B/Yam) and Victoria-like (B/Vic) were identified by molecular biology. In addition, clinical profile, outcome and annual prevalent lineage and vaccine strain match were reported. In general, 370 Flu B samples were characterized. During that period, both lineages B/Yam and B/Vic co-circulated in an alternating pattern with a frequency of 47% and 53%, respectively. Flu B infection was prevalent in females (61%). B/Yam infected equally both genders, while B/Vic was predominant in females (71%). The median age of patients infected by B/Vic (23y; 11-35) was lower than in patients infected by B/Yam (32y; 12-50). Vaccine lineage mismatch was observed in the 2013 season, with a high concentration of SARI cases in that year. We also observed that B/Vic was associated with a larger number of SARI cases (62%), while B/Yam was associated with influenza-like illness (ILI) cases (61%). During the same period, there were differences in the strains circulating in Paraná State. B/Vic was prevalent in the northwest (66%) and Yamagata in the southeast (71%) regions. The identification of circulating strains in the community is a great benefit, providing information for a broad discussion on the need to use of quadrivalent vaccine in the region, as well as the risk population that should be covered thereby.

Keywords: influenza B lineages, influenza vaccine, respiratory infection surveillance.

BACKGROUND

Seasonal influenza is an acute viral respiratory infectious disease caused by influenza viruses (mainly influenza types A and B), which have a high transmissibility and worldwide distribution, causing outbreaks and epidemics due their cyclical antigenic variations.¹

Respiratory infections caused by influenza viruses are a serious public health problem with high morbidity and affect each year around 10% of the world population, all social classes and age groups, impacting economically due to the direct spending by the health services and workforce productivity losses during outbreaks. Furthermore these viruses can potentially cause severe complications and death.^{2,3}

The main focus of influenza studies has usually been on influenza A virus (Flu A), which is associated with high genetic variability and severe pandemics. Flu B viruses form a homogeneous group that began to separate into two genetically and antigenically distinct strains (Victoria and Yamagata) in the 1980s⁴ but less than 10% of Flu B infections are molecularly characterized due to an old concept that the B infections have a smaller impact on public health.^{5,6}

However, epidemiological indicators have shown a substantial effect of Flu B, both on the number of children's deaths, and on the development of SARI, with a high number of admissions in intensive care units.^{7,8} These evidences have highlighted the need to evaluate the Flu B infections profile, seeking to understand the dynamics of this virus dispersion in the community, as well as the effectiveness of preventive measures adopted by the National Immunization Programs.

Between 2013 and 2016, 10,033 SARI cases due to influenza were confirmed in Brazil, with 16 deaths. Flu B accounted for 1,437 (14%) of the SARI cases and exhibited an increase of the disease burden when death rates were assessed: in 2013 death rates were 6%, in 2014 13%, in 2015 16% and in 2016 until the Epidemiological Week (EW) 14 (before the beginning of the flu season) death rates were 8%.^{9,10,11,12}

The aim of this study was to characterize by molecular methods the Flu B lineages in clinical samples collected by the epidemiological surveillance system and delivered to the Health Public Laboratory of Paraná State (Lacen-PR), in order to describe the clinical profile of this infection and to evaluate the match between the annual prevalent lineage and the vaccine strains during three influenza seasons.

MATERIAL AND METHODS

Study design

A cross-sectional study was performed on data from 2013 to 2016. Respiratory samples - nasopharyngeal aspirate (NPA), broncho alveolar lavage (BAL) or nasopharyngeal swab positive for influenza B collected from SARI in-patients and from outpatients with influenza-like illness (ILI) from Paraná State, Southern Brazil, were analyzed. During that period, a total of 34,338 respiratory samples were tested to detect the presence of the influenza virus. Out of those 1,531 (4.4%) were confirmed to contain the Flu B virus using one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Considering a 9% influenza B prevalence (according to literature data), confidence level of 95% and a sample error of 5%, 379 cases were estimated as a representative sample. All samples of SARI patients (n=193, 51%) and 186 (49%) samples of ILI outpatients were evaluated. Epidemiological and clinical data were collected during the review of the epidemiological notification form delivered with the sample. The Ethics Committee for Institutional Research reviewed and approved this study (#18714013.4.0000.0096).

Methods

Molecular characterization - nucleic acid was isolated from samples stored at -80°C, using the High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Molecular System Inc, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Nucleic acid concentration and purity (A260/280) were analyzed by spectrophotometry (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Average absorbance ratios were calculated and compared against a standard absorbance ratio; values between 1.9 and 2.1 were considered an extraction with high oligonucleic level of purity. For influenza B lineages identification, *one-step* qRT-PCR method was used with a pair of primers that amplify the region of hemagglutinin: F432 (5'-ACCCTACARAMTTGGAACYTCAGG-3') and R479 (5'-ACAGCCCAAGCCATTGTTG-3') and specific probes for each lineage marked with the fluorophore VIC and FAM: B/Yam, MGB437 (5'-FAM-AATCCGMTYTTACTGGTAG-MGB-3') and B/Vic, MGB470 (5'-VIC-ATCCGTTTCCATTGGTAA-MGB-3')⁴. The reaction conditions were set to a total volume of 25 µL using *TaqMan® One Step RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc.) according to the manufacturer's instructions, 600 nM reverse primer R479, 150 nM of sense primer F432, 150 nM of probe MGB437, 100 nM of probe MGB470 and 3 µL of RNA. Amplification was carried out in the equipment *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (AB Applied Biosystems Inc, CA, USA) set, following the cycling conditions: 50°C for 10 min (RT), 95°C for 5 min

(activation) followed by 45 cycles at 95°C for 15 sec (denaturation) and 60°C for 30 sec (hybridization).

Clinical and epidemiological data were reviewed in the reporting forms of the epidemiology division (Health Secretary from Paraná State).

Data analysis

Each influenza season was categorized as matched or mismatched after comparing the most commonly circulating influenza B lineage and the influenza vaccine composition administered during that period.

Data were compiled using the JMP software, version 5.2.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and were analyzed using the GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Baseline demographic and clinical characteristics with normal and non-normal distributions were presented as means \pm standard deviation and medians with interquartile ranges (IQR), respectively. Clinical and epidemiologic characteristics of *Victoria-like* and *Yamagata-like* influenza B-infected patients were compared. Fisher's exact test, independent t-test, or Wilcoxon-Mann-Whitney U test were used where appropriate. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated for the variables included. The level of significance was considered to be $p < 0.05$.

RESULTS

Out of 379 samples selected in this study, 370 (98%) were molecularly characterized as Yamagata and Victoria lineages. The number of samples evaluated by year was 104 in 2013 (28%), 43 in 2014 (12%), 125 in 2015 (34%) and 98 (26%) in 2016. The years with more cases of Flu B were 2013 and 2015, the first with more SARI cases in the last 10 years and the second with ILI prevalence. In 2014 the influenza virus circulation was low. In the period analyzed both lineages co-circulated in an alternating pattern with a frequency of 53% Influenza B/Victoria (B/Vic) and 47% Influenza B/Yamagata (B/Yam). The groups most affected by influenza B were women, young adults, with no difference among ethnic groups, independently of their risk condition. Differences in infection patterns between patients infected by B/Vic and B/Yam lineages were observed, as shown in Table 1.

Overall, Flu B was found to infect mainly women (61%). However, when comparing the two strains, a predominance of women infected by the B/Vic lineage (71%) was observed, while B/Yam exhibited the same prevalence in both genders. Among those women, only 39 (17%) presented some risk factor for severe disease, and 5 of them were pregnant. At least 56% of those women were not in the reproductive age. In about 50% of the cases no other risk factor was reported in the notification form.

The age group between 3 to 29 years was the most infected by Flu B (53%), and there was no case of infection in children under 1 year of age. The median age of patients infected by B/Vic (23y; 11-35) was significantly lower than in patients infected by B/Yam (32y; 12-50).

The disease severity was evaluated in this study according to the following identifications on the notification form: presence of ILI or SARI. A higher frequency of SARI diagnosis among patients B/Vic-infected was found as compared to flu B/Yam positive cases (62% vs. 36%, respectively). Patients B/Vic-infected exhibited more risk to develop SARI (OR 2.84; CI95% 1.86 to 4.34), in contrast with what was observed in B/Yam-positive patients (OR 0.35; CI95% 0.23 to 0.54).

Regarding the presence of severe disease risk factors, no difference was observed between B/Vic- and B/Yam-infected individuals. Oseltamivir was used in 18% of SARI cases, and in only 40% of these cases within the first 48 hours of symptoms onset. This late medication use was more frequent among patients infected with B/Vic than B/Yam lineages (60% vs. 50%, $p = 0.001$, respectively).

The distribution of Flu B infections in 22 health regional districts in Paraná State was also evaluated. It was observed that the Flu B lineages frequencies were significantly different in the different regions of the State ($p=0.0070$), as shown in figure 1. Most of Flu B cases observed in the northwest of the State was B/Vic lineage (67%; 72/107). In addition, in

that same region a high number of severe disease – 36% (66/184) of total SARI cases was also observed. At the same time, B/Yam was the more prevalent lineage circulating in the southeastern region: 60% (40/67).

As illustrated in figure 2, when comparing strain circulation and vaccine composition during the three seasons, a mismatch was observed in 2013 - the circulating strain was B/Vic and the vaccine strain was Yamagata-like. At the same time, a higher incidence of SARI cases occurred in the mismatch year, and a higher number of ILI cases were notified in the subsequent years.

DISCUSSION

Influenza B compared to influenza A is a more homogenous virus and usually circulates less frequently, but both viruses are associated with annual epidemics.¹³ In a global scale, several reports have warned about the high mortality associated with Flu B virus in the inter-pandemic periods, mainly in the seasons where its circulation is higher than influenza A, enhancing the need for worldwide studies that assess the burden of diseases associated to this infection. In Brazil, although the influenza infection surveillance has been implemented since the 2000s, data on influenza B lineages circulation are scarce and usually limited to few seasons. In this report, the influenza B strains identification was carried out during 3 subsequent seasons in a large number of samples from the two influenza surveillance systems in place in this region: ILI sentinel surveillance and the universal SARI notification.

Overall, Flu B viruses were identified in 31% of influenza cases. The average influenza B found among SARI samples investigated in this analysis was 8.7%, ranging from 2% to 15% during the study period; these data were consistent with the European surveillance service that reports 9.5% of SARI cases and 47% among flu cases.^{14,15,16}

Previous reports on influenza B have shown that the estimates about Flu B lineage circulation during 10 influenza seasons were correct in only 50% of the cases.^{17,13} Thus, the occurrence of mismatch with the vaccine during the influenza seasons is unpredictable. In Brazil, significant levels of both influenza B lineages (B/Vic and B/Yam) co-circulation and vaccine mismatch were described in five influenza seasons (2002, 2005, 2008, 2010, and 2013).^{18,19} Since the influenza quadrivalent vaccine has become available, it is important that local assessments be made of the benefits derived from the adoption of these guidelines, as well as the definition of the optimal target populations. Moreover, the co-circulation of both influenza B lineages could cause the emergence of new lineages due to reassortment between the different strains as demonstrated in previous studies in Bangkok, Malaysia and Thailand. Those studies detected an HA gene of the Victoria lineage and an NA gene of the Yamagata lineage, while the other displayed an NA gene of the Victoria lineage and an HA gene of the Yamagata lineage.^{20, 21, 22}

The occurrence of the vaccine lineage mismatch in the 2013 season was demonstrated. In Brazil, although the vaccines in the 2012 and 2013 seasons were composed of the Yamagata strain, the entry of this lineage was only observed after 2014.²³ A study by Paiva *et al.*²⁴ showed that across different regions of Brazil, 16% of influenza cases in clinical specimens from sentinel units in 2013 were caused by the B/Vic lineage while the remaining cases were caused by the influenza A virus. Barros *et al.* in a recent study also observed a high mismatch in Brazil – 91.4% circulating B/Vic virus - and South America

(52% B/Vic) in 2013²⁵. Previous studies suggested that even with a partial mismatch over the years, due to the unpredictability of influenza B lineage circulation, the morbidity and mortality in epidemics that occurred during the vaccine mismatch were substantial. Lo *et al.* in a recent study observed that in Taiwan out of the 66.9% deaths in 2012, 87.2% showed the presence of vaccine opposite lineage.²⁶

Among 761 Flu B cases in Paraná State in 2013, 46% were associated with severe disease.²⁷ These results showed the ineffectiveness of vaccination coverage as a consequence of the mismatch between the circulating strain and the vaccine strain. A high vaccine coverage level could potentially decrease virus transmission, reducing the occurrence of outbreaks and severe disease as shown in the years 2014, 2015 and 2016 when the circulating lineages matched the vaccine lineages, so the number of SARI cases was less than 50% of ILI cases, suggesting that the correct application of immunization directly impacts health and can protect the population reducing the development of severe illness.

Due to the lack of information in the surveillance notification form, it was not possible to evaluate clinical differences between the Flu B lineages. Data suggest that B/Vic patients reported more symptoms than B/Yam patients, but a total of 51% of the records did not contain this information.

The conditions that interfere in the development of severe disease evaluated in this study should include risk factors, time from symptoms to hospital care and use of medication. The risk factors described in the patients assessed were: age < 2 years and > 60 years; cancer; diabetes; pregnancy; asthma; chronic adrenal hyperplasia; HIV; immunosuppression. No difference in risk conditions between patients infected by B/Vic and B/Yam was observed.

In both lineages, it was observed that the use of oseltamivir was much lower than expected according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health that recommends the use of oseltamivir in ILI patients with risk factors and in all SARI patients. Only 18% of the patients who met the criteria for treatment received the drug. When B/Vic patients were evaluated, at least 74% should have been medicated, but adding the percentage of patients who reported having used oseltamivir to that of patients who did not report the information on the notification form, only 56% of B/Vic patients would have the chance of medication.²⁸

In contrast to other clinical-epidemiological findings, a predominance of influenza B infection was observed in women. The databases were composed of Flu B samples collected in the same proportion for women and men (46% and 54% respectively), but women experienced more SARI and men more ILI ($p = 0.0043$ OR 1.470; CI95% 1.133 to 1.908); therefore, we can discard the hypothesis that the correlation found in this study is due to a sample bias. Since an exposure to and infection with these viruses do not include the

behavioral factor as an infection risk, both genders have the same chance of being exposed and infected. Recent studies on the epidemiology of Flu B and the epidemiological characterization of its lineages corroborate the literature data. Regardless of vaccine strain mismatch, studies in Brazil, Australia, China, Slovenia, India and England did not report a greater incidence of Flu B or its lineages' infections in women.^{20,25,29,30,31,16}

Although studies on respiratory infections point at a concentration of cases in children under five years of age, in this study an infection prevalence in older children and teenagers was observed. A serologic study of European children 0 to 7 years of age who, almost none, had been previously vaccinated against influenza, demonstrated that children accumulated a natural immunity to influenza B more slowly than to influenza A.³² This observation likely explains the increased incidence of influenza B illness in relation to influenza A among older children and young adults.

Comparing the lineages, the median age of B/Vic infected patients was lower than in B/Yam patients. This age difference between lineages has previously been reported in studies in Australia, Hong Kong and Slovenia.^{29,30,31}

In general, reports showed infection prevalence in schoolchildren (3-15 years).^{20, 29} Even in reports that found age groups prevalence among individuals 5-29 years old, as Barros *et al*.²⁵, a higher proportion of children aged 5–9 years and 10–19 years¹⁷ was reported. Moreover, a greater infection frequency in teenagers was observed as compared to young children. Horthongkham *et al.* in a recent study in Bangkok indicated that 42% of the Flu B infection occurred in patients aged between 5 and 14 years. During the 2015-2016 season in England, a larger portion of young adults (15-44) was affected compared to the 2014-2015 season where the highest rate of admissions occurred in those patients over 65 years of age.¹⁶ In Australia, Barr *et al.* reported an age infection between 3-15 years in 2015, but not in 2008 despite the high rate of FluB detected in children under five years of age.²⁹ On the other hand, a study in Hong Kong in 2015 had shown that children under 15 years of age had a 13-fold increased risk of secondary influenza infection with a B/Vic virus than with a B/Yam virus.³¹ The reasons for the apparent different age susceptibility between the two B lineages described in this study are still unknown. The age infection in different countries is closely related with the circulating strain, the immunization strategies and the rate of vaccination coverage. Thus, more studies are required to determine if there is indeed any difference in outcomes following severe infections with either one of the B lineages in different age groups.

The reintroduction of the B/Vic lineage could explain why this lineage infected younger adults more than lineage B/Yam. In USA, when B/Vic reemerged it produced a series of intense community epidemics that swept from northeast to central Texas, resulting in school closings. The high attack rates at that time due to B/Vic in schoolchildren

demonstrated the lack of cross-protection provided by B/Yam, since children aged <12 years had no exposure to B/Vic prior to 2002.³³

A surveillance study in Finland between 1999 and 2012 showed that the vaccine antigen for the B lineage did not match the predominant circulating virus for 10.8% of total flu infections; the proportion of individuals at risk was greater than 16.8% for 10–14 years of age students and lower for elderly persons.³⁴ A consequence of these findings is that adolescents and young adults might benefit the most from the addition of a second influenza B lineage to the seasonal influenza vaccine through herd immunity.³⁵

With regard to the higher virulence of the B/Vic lineage suggested by the clinical-epidemiological analysis, other studies have not shown any difference in clinical manifestation for the different B lineages,^{30,31} but long-term data on hospitalizations and deaths are lacking. In a study by Paddock *et al.* on deaths attributed to influenza B in the US from 2000 to 2010 a higher proportion of infections due to B/Vic compared with B/Yam was reported.³⁶ Horthongkham *et al.* (2016)²⁰ found no differences in clinical manifestations between lineages, but in terms of number of death cases and length of hospitalization, patients infected by B/Vic have experienced the worst evolution. As in the case of this study, they observed that the Victoria lineage caused more detrimental effects than the Yamagata lineage. Moreover, a higher number of those patients infected with Victoria lineage viruses had underlying diseases, compared with those infected with Yamagata lineage viruses - data that could not be evaluated in this study.

A theory for the difference in the prevalence of lineages observed in certain regions in the State of Parana would be the distinct pattern of lineage circulation in the border State: to the north (São Paulo State) and to the south (Santa Catarina State). It is known that the northern states of Brazil suffer a high influence of the circulating virus in North America. A study conducted by Alonso *et al.* (2007)³⁷ assessed the seasonal pattern of influenza in all regions of Brazil, demonstrating an annual "wave" phenomenon towards the south, with the beginning of viral circulation in equatorial zones, with an interval of 3 months between the peaks of the regions north and south of the country. The reintroduction of the B/Vic in the north of the State could explain the high number of SARI cases in an area where high temperatures should not support so much concentration of flu cases and evolution to severe disease. Unfortunately, there are no substantial molecular epidemiology data in those States in order to evaluate this parameter. In a study carried out in São Paulo State with inpatients of a tertiary hospital it was reported that between the years 2008-2010 B/Yam was prevalent and the reinsertion of B/Vic just occurred in 2011 and the B/Vic prevalence remained until

2013 (of the 30 Flu B samples investigated during that period all were B/Vic).¹⁹ No other studies evaluated differences among lineage circulation in regions of the same territory.

Contrary to what is reported, we did not observe a relationship between cold weather and disease severity.³⁸ SARI cases were prevalent in the region that deploys the highest temperature averages.³⁹

In 2012 in the U.S. Reede *et al.*⁴⁰ estimated a potential public health benefit for the use of quadrivalent vaccines. The study estimated a range of 2,200–970,000 fewer influenza illnesses, 14–8,200 fewer influenza-associated respiratory hospitalizations, and 1–485 fewer influenza-related respiratory deaths. In Brazil no data are available about an estimate of cost/benefit for the adoption of a quadrivalent vaccine, but the evidence observed in this study that the inversion between prevalence of severe and mild disease occurs in years of effective vaccination coverage, suggests that a great benefit in changing the immunization strategies would ensue.

CONCLUSIONS

Further studies are required to determine the causes of differences in influenza B epidemiology. It is usually not possible to predict with reasonable accuracy the impact of the upcoming influenza season based on historical data. Various reports have shown that Victoria and Yamagata lineages often co-circulate in the same season. The frequency of vaccine mismatch has been high in recent years expanding the consequences in terms of influenza cases, influenza-related deaths, economic and public health costs. This has a direct implication on vaccination strategies, including the decision to adopt a quadrivalent influenza vaccine. Thus, updated epidemiological data for molecular characterization, prevalence and impact of influenza B lineages in the community are crucial to determine preventive measures seeking to control this serious public health problem.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

SMR participated to the conception/design of the review, supervised the analysis, and interpreted the data. BAL performed the tests, collected or assembled the data, and wrote the preliminary manuscript. LAP, MBN, LRV, MCD, IR and MP performed molecular tests for influenza B screening. All authors read and approved the final manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

SMR and MCD have been a speaker for Sanofi-Pasteur. BAL, LAP, MBN, LRV, MCD, IR and MP have no conflict of interest.

An unrestricted education grant from Sanofi Pasteur vaccines was provided for this study. The funders of the study had no role in data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

REFERENCES

- [1] Webster RG; Wright SM, Castrucci MR, Bean WJ, Kawaoka Y. Influenza - a model of an emerging virus disease. *Intervirology* 1993; 35:16–25.
- [2] World Health Organization. Influenza Fact Sheet N.211, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>; 2014 [accessed 05.10.16].
- [3] Noah DL, Noah JW. Adapting global influenza management strategies to address emerging viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013; 305:108–117.
- [4] Biere B, Bauer B, Schweiger, B. Differentiation of influenza B virus lineages Yamagata and Victoria by real-time PCR. *J. Clin. Microb.* 2010; 48:1425-1427.
- [5] Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J Gen Virol*. 2011; 92: 1-17.
- [6] Stuart-Harris CH, Schild GC, Oxford JS. Influenza: the viruses and the disease. *Microbial Pathogenesis* 1985; 2(3):234-235.
- [7] Glezen WP, SCHMIER JK, KUEHN CM, RYAN KJ. The burden of influenza B: a structure literature review. *American Journal of Public Health* 2013; 103(3):43-51.
- [8] Caini S, Sue Huang Q, Ciblak MA, Kuszniarz G, Owen R, Wangchuk S, *et al.* Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2015; 9:3–12.
- [9] Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2013. Informe epidemiológico, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza; 2014 [accessed 10.14.16].
- [10] Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2014. Informe epidemiológico, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza; 2015 [accessed 10.14.16].

[11] Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2015. Informe epidemiológico, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza; 2016 [accessed 10.14.16].

[12] Secretaria de Vigilância da Saúde – Ministério da Saúde Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 14 de 2016. Informe epidemiológico, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza; 2016 [accessed 10.14.16].

[13] Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. HUM VACCIN IMMUNOTHER. 2012; 8(1):81-8.

[14] PUBLIC HEALTH ENGLAND. Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2013 to 2014, https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2013_2014.pdf; 2014 [accessed 12.10.2016]

[15] PUBLIC HEALTH ENGLAND. Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2014 to 2015, https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2014_2015.pdf, 2015 [accessed 12.10.2016]

[16] PUBLIC HEALTH ENGLAND. Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the United Kingdom: Winter 2015 to 2016, https://www.gov.uk/.../Flu_Annual_Report_2015_2016.pdf, 2016 [accessed 12.10.2016]

[17] Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. Vaccine 2010; 28(9):2149-2156.

[18] Oliveira M, Motta F, Soares S, Resende P, Carney S, Costa J. Mismatch between vaccine strains and circulating influenza B viruses in different regions of Brazil: 2001–2013. Options for the control of influenza 2013; p. 382.

[19] Perosa AH, Granato C, Bellei N. Detection of influenza B lineages from 2001 to 2013 in a tertiary hospital in the city of São Paulo. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110(5):606-610.

- [20] Horthongkham N, Athipanyasilp N, Pattama A, Kaewnapan B, Sornprasert S, Srisurapanon TS, *et al.* Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014. PLoS ONE 2016; 11(7).
- [21] Oong XY, Ng KT, Lam TT, Pang YK, Chan KG, Hanafi NS, *et al.* Epidemiological and evolutionary dynamics of influenza B viruses in Malaysia, 2012–2014. PLoSOne.2015;10(8).
- [22] Tewawong N, Suwannkarn K, Prachyangprecha S, Korkong S, Vichi wattana P, Vongpunsawad S. Molecular epidemiology and phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014. PLoSOne. 2015;10(1).
- [23] Organização Pan Americana de Saúde. Situation Report, http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23932&Itemid=; 2015. [accessed 05.10.15].
- [24] Paiva TM, Benega MA, Silva DB, Santos KC, Cruz AS, Hortenci MF, *et al.* Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in Sao Paulo, Brazil, 1996–2012: implications for vaccine composition strategy. J Med Virol. 2013; 85(11):1983–1989.
- [25] Barros ENC, Cintra O, Rosseto E, Freitas L, Colindres R. Patterns of influenza B circulation in Brazil and its relevance to seasonal vaccine composition. Braz. J. Infect. Dis. 2016; 20(1):81-90.
- [26] Lo YC, Chuang JH, Kuo HW, Huang WT, Hsu YF, Liu MT, *et al.* Surveillance and vaccine effectiveness of an influenza epidemic predominated by vaccine-mismatched influenza B/Yamagata-lineage viruses in Taiwan, 2011-12 season. PLOS ONE 2013; 8 (3).
- [27] Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Curitiba: Informe CIEVS. <http://www.sesa.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2811>, 2013 [accessed 05.10.2015].
- [28] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de tratamento de Influenza: 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças

Transmissíveis.

http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Protocolo_de_Tratamento_de_Influenza_2015.pdf, 2014 [accessed 12.14.2015].

[29] Barr I, Vijaykrishna D, Sullivan S. Differential age susceptibility to influenza B/Victoria lineage viruses in the 2015 Australian influenza season. *Euro Surveill.* 2016; 21(4).

[30] Socan M, Prosenc K, Ucakar V, Natasa B. A comparasion of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. *J. Clin. Virol.* 2014; 61:156-160.

[31] Xu C, Chan KH, Tsang TK, Fang VJ, Fung RO, Ip DK.; *et al.* Comparative Epidemiology of Influenza B Yamagata- and Victoria-Lineage Viruses in Households. *Am J Epidemiol.* 2015; 182(8):705-13.

[32] Bodewes R, De Mutsert G, Van der Klis FR, Ventresca M, Wilks S, Smith DJ, *et al.* Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18:469-76.

[33] Glezen PW. Editorial commentary: changing epidemiology of influenza B virus. *Clin Infect Dis.* 2014; 59(11): 1525–1526.

[34] Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T. Impact of influenza B lineage level mismatch between trivalent seasonal in fluenza vaccines and circulating viruses, 1999 - 2012. *Clin Infect Dis.* 2014; 59:1519–1524.

[35] Baguelin M, Flasche S, Camacho A, Demiris N, Miller E, Edmunds WJ. Assessing optimal target populations for influenza vaccination programmes: an evidence synthesis and modelling study. *PLoS Med.* 2013; 10(10).

[36] Paddock CD, Liu L, Denison AM, Bartlett JH, Holman RC, Deleon-Carnes M, *et al.* Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal influenza B virus infection. *J Infect Dis.* 2012; 205(6):895-905.

- [37] Alonso WJ, Viboud C, Simonsen L, Hirano EW, Daufenbach LZ, Miller MA. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. *Am. J. Epidemiol.* 2007; 165(12):1434-1442.
- [38] Vidal, L R, Siqueira MM, Nogueira MB, Raboni SM, Pereira LA, Takahashi GR, *et al.* The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(2):180–185.
- [39] SIMEPAR. Sistema metereológico do Paraná. Histórico de condições climáticas dentre os anos 2013 a 2016, http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Protocolo_de_Tratamento_de_Influenza_2015.pdf; 2016 [accessed 10.22.2016].
- [40] Reed C, Meltzer MI, Finelli L, Fiore A. Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Vaccine* 2012; 30:1993-1998.

Table 1 – Clinical-epidemiological data of Flu B virus-infected patients in Paraná State, Brazil 2013 to 2016

Characteristics	Flu B n=370 (%)	B/Vic n= 196 (%)	B/Yam n=174 (%)	*P value
Sex				
Male	146 (39)	56 (29)	90 (52)	<0.0001
Female	224 (61)	140 (71)	84 (48)	
Median age	24; 12-42	23; 11-35	32; 12-50	0.0247
Age group				
≤ 2	20 (5)	14 (7)	6 (3)	<0.0001
3-15	107 (29)	58 (30)	49 (29)	
16-29	90 (24)	67 (34)	23 (13)	
30-45	66 (18)	31 (16)	35 (20)	
46-60	46 (13)	14 (7)	32 (18)	
> 60	42 (11)	12 (6)	30 (17)	
Ethnic group				
African descendant	41 (11)	22 (11)	19 (11)	0.1386
Caucasian	197 (53)	113 (58)	84 (48)	
NI	132 (36)	61 (31)	71 (41)	
Severity				
ILI	186 (50)	75 (38)	111 (64)	<0.0001
SARI	184 (50)	121 (62)	63 (36)	
Risk factor				
Yes	72 (19)	33 (17)	39 (22)	0.1316
No	88 (24)	54 (27)	34 (20)	
NI	210 (57)	109 (56)	101 (58)	
Symptoms				
Fever	165 (45)	106 (54)	59 (34)	<0.0001
Cough	171 (46)	109 (56)	62 (36)	
Sore throat	107 (29)	71 (36)	36 (21)	
Myalgia	92 (25)	60 (16)	32 (18)	
Respiratory distress	64 (17)	47 (24)	17 (10)	
Others	40 (11)	30 (15)	10 (6)	
NI	189 (51)	81 (41)	108 (62)	
Symptoms duration until hospital care				
Median days	3; 1-5	4; 2-5	2; 1-4	0.0005
Number of patients with hospital care ≤ 48hs	153 (41)	66 (34)	87 (50)	0.0016
Number of patients with hospital care > 48hs	217 (59)	130 (66)	87 (50)	
Oseltamivir treatment				
SARI	YES	39 (11)	27 (14)	0.0010
	NO	80 (22)	57 (29)	
ILI	YES	8 (2)	1 (0)	
	NO	101 (27)	52 (27)	
NI		142 (38)	59 (30)	

In bold - values statistically significant. NI – not informed.



Figure 1 – Distribution of the Flu B lineages prevalence in the Paraná State during the years 2013-2016.

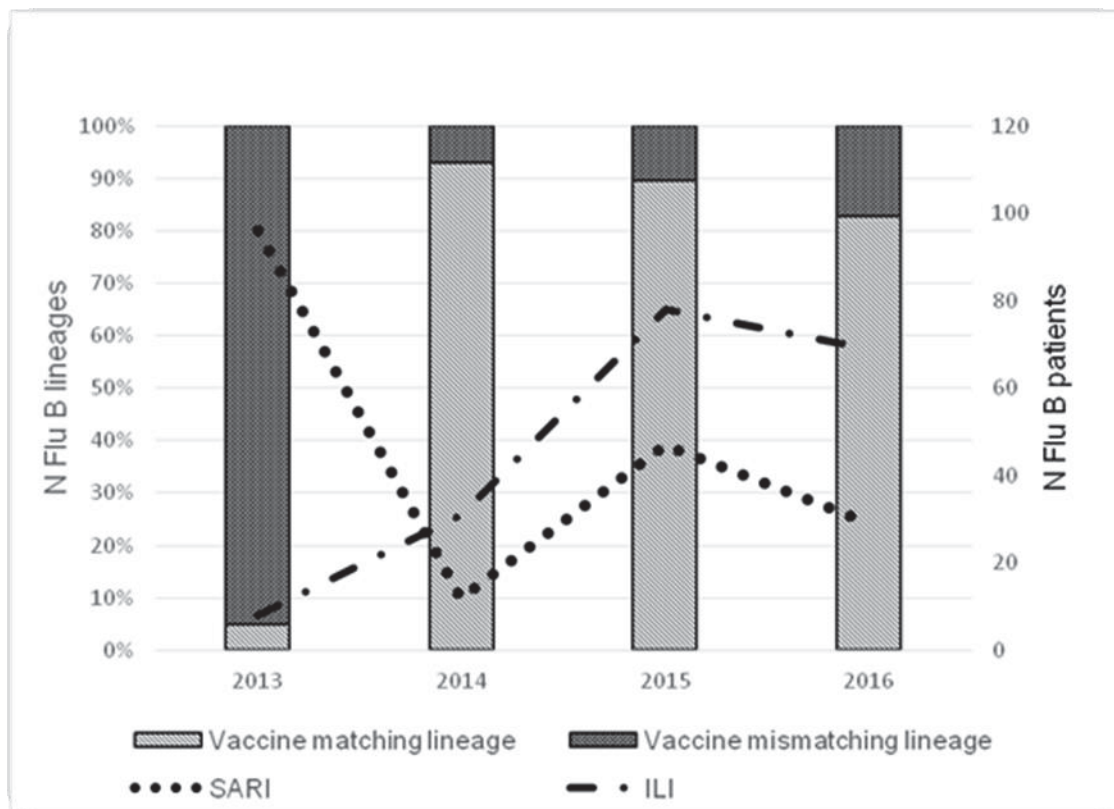


Figure 2 –Flu B lineages frequency by year and relation with disease severity reported by infected flu B patients. SARI = Severe acute respiratory infection. ILI = influenza-like illness. The 2016 data are until EW 44.